SÄULENCHROMATOGRAPHIE AN IONENAUSTAUSCHERN GRUNDLAGE, METHODIK UND IHRE ANWENDUNG BEI UNTERSUCHUNGEN VON PARAPROTEINÄMIEN

AHMAD FATEH-MOGHADAM

1971

Aus der I.Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof.Dr.H.Schwiegk

Säulenchromatographie an Ionenaustauschern

Grundlage, Methodik und ihre Anwendung bei Untersuchungen von Paraproteinämien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ahmad Fateh-Moghadam
Teheran/Iran

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter	: Priv.Doz.Dr.M.Knedel
Mitberichterstatter	: Prof.Dr.H.Schwiegk
Dekan	: Prof. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung	: 9.2.71

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Einführung in die Chromatographie	9
2.1	Arten der Chromatographie	
2.1.1	Adsorptionschromatographie	9
2.1.2	Verteilungschromatographie	1o
2.1.3	Molekularsiebeffekte	11
2.1.4	Elektrochromatographie	12
2.1.5	Ionenaustauschchromatographie	12
2.1.5.1	Grundzüge der Ionenaustauschchromatographie	13
2.1.5.2	Frontenanalyse	19
2.1.5.3	Verdrängungsanalyse	2o
2.1.5.4	Elutionschromatographie	21
2.1.5.5	Gradientenelutionschromatographie	22
2.2	Trägerstoffe	23
2.2.1	Kunstharzionenaustauscher	25
2.2.2	Mineralische und synthetisch organische Ionenaustauscher	25
2.2.3	Kohlenionenaustauscher	26
2.2.4	Cellulose-Ionenaustauscher	27
2.2.4.1	Nativ-Cellulose, allgemeines Bauprinzip	27
2.2.4.1.1	Cellulose als Ionenaustauscher	29
2.2.4.2	Substituierte Cellulose-Ionenaustauscher	3o
2.2.4.2.1	Oxydierte Cellulose- bzw. -Oxycellulose	31
2.2.4.2.2	Phosphorylierte Cellulose	33
2.2.4.2.3	Sulfoaethylcellulose	35
2.2.4.2.4	Carboxymethyl-Cellulose (CM-Cellulose)	35
2.2.4.2.5	Diäthylaminoäthylcellulose (DEAE-Cellulose)	39
2.2.4.2.6	Aminoacethyl-Cellulose (AE-Cellulose)	41
2.2.4.2.7	ECTEOLA-Cellulose	41
2.2.4.2.8	TEAE-Cellulose	42
2.2.4.2.9	Guanidoäthyl-Cellulose (GE-Cellulose)	42
2.2.4.2.1o	Paraminobenzyl-Cellulose (PAB-Cellulose)	42
2.2.4.2.11	Hydroxylapalit-Cellulose	42
2.2.4.2.12	Poliäthylenimin-imprägnierte Cellulose (PEI-Cellulose)	43
2.2.5	Ionenaustauscher auf Sephadex-Basis	43
2.2.6	Eigenschaften	45
2.2.6.1	Korngröße	45
2.2.6.2	Kapazität	46
2.2.6.3	Selektivität	48
2.2.6.4	Quellung	5o
2.2.6.5	Vernetzung	51
2.2.6.6	Stabilität und Verschleiß	52

3	Methodik	54
3.1	Methodik der Gradientenelution	54
3.1.1	Grundlage	
3.1.2	Kontinuierliche Gradienten	56
3.1.2.1	Apparaturen	56
3.1.2.2	Berechnung der Gradienten	66
3.1.2.3	Empirische Bestimmung des Gradienten	7o
3.1.2.4	Einfluss des Gradienten auf die Elution	71
3.1.3	Diskontinuierliche Gradientenelution	75
3.1.4	Säule	77
3.1.4.1	Säulenfüllung	8o
3.1.4.1.1	Störung in der Säulenfüllung	83
3.1.4.1.2	Waschen und regenerieren	84
3.1.4.1.3	Aufbewahrung	86
3.1.5	Analysenlösung	87
3.1.6	Strömungsgeschwindigkeit	88
3.1.7	Sammeln der Fraktion	91
3.1.7.1	Zeitgesteuerter Fraktionskollektor	91
3.1.7.2	Volumengesteuerter Fraktionskollektor	92
3.1.7.3	Tropfengesteuerter Fraktionskollektor	92
3.1.7.4	Gewichtsgesteuerter Fraktionskollektor	92
3.1.7.5	Spezieller Fraktionskollektor	93
3.1.8	Doppelsäulentechnik	94
3.2	Nachweis, Charakterisierung und Identifizierung der Fraktionen	95
3.2.1	Allgemeines	95
3.2.2	Nachweis der Farbkomponenten an der Säule	96
3.2.3	Messung der optischen Dichte	96
3.2.4	Konzentrierung	97
3.2.5	Papierelektrophorese	99
3.2.6	Immunelektrophorese	1oo
3.2.7	Zweidimensionale Agardiffusionsmethode nach Ouchterlony	1o4
3.2.7.1	Prinzip der Methode	1o4
3.2.7.2	Durchführung der Methode	1o4
3.2.8	Modifizierte Immunelektrophorese nach Ossermann	1o5
3.2.9	Sedimentationsanalytische Untersuchung mittels Ultrazentrifuge	1o6
3.2.1o	Präparative Elektrophorese mit Kartonpapier als Trägermaterial	1o6

4	Untersuchungsgut	108
5	Ergebnisse	109
5.1	Serum von Normalpersonen	109
5.2	Serum von Patienten mit γG-Paraproteinämie	116
5.3	Serum von Patienten mit γA-Paraproteinämie	126
5.4	Serum von Patienten mit γM-Paraproteinämie	128
5.5	Serum von Patienten mit sogenanntem α_2-Plasmocytom	130
5.6	Serum von Patienten mit Doppelparaproteinämie	133
5.7	Serum von Patienten mit Dysproteinämie	135
5.8	Serum von Patienten mit Alloalbuminämie	136
6	Diskussion	138
7	Zusammenfassung	145
8	Literaturverzeichnis	147

Die Anfänge der Chromatographie und zwar speziell der Papier=chromatographie gehen zurück auf die genialen Versuche des Botanikers Friedlieb Ferdinand R u n g e [179] (18o),[181] der mit Hilfe der Kapillarwirkung des Papiers Farbstoffe trennte.Diese Runge'sche Methode wurde seinerseits nicht weiter ausgearbeitet und geriet in Vergessenheit.

1861 begann S c h ö n l e i n(198) die Kapillaranalyse zu verfeinern und diese als analytische Methode anzuwenden. G o p p e l s r o e d e r(73) führte die Kapillaranalyse in die Farbstoffchemie ein.Die von ihm angegebene Chromatographie=kammer unterscheidet sich nicht wesentlich von den heutigen Kammern.Der wesentliche Unterschied zwischen diesen früheren Verfahren und der heutigen Methode besteht darin,daß man heute, die zu untersuchende Mischung zunächst auf dem Papier aufträgt und dann mit einem Überschuss eines reinen Lösungsmittels be=handelt,während man früher die zu untersuchende Lösung selbst in das Papier aufsaugen ließ.Der russische Forscher T s w e t t (229) trennte die Pigmente der Pflanzenblätter ,indem er ihre Lösungen in Petroläther durch eine Säule von gepulvertem Calzium=carbonat hindurchschickte.Dabei bildeten sich auf der Säule Zo=nen aus,die teils gelb,teils grün gefärbt waren.Wegen dieser am Adsorbens gebildeten Farbzonen nannte er diese Methode Chroma=tographie.Diese von Tswett entwickelte,klassische Ausführungsform bildete die erste Grundlage der Adsorptionschromatographie. K u h n (122) und seine Schüler haben die Tswettsche Methode weiter ausgearbeitet.Trotz der bedeutenden Erfolge aus denen die überragende Selektivität derartiger Methoden hervorging,blieb

die Untersuchung nur auf gewisse Stoffklassen (lyophile Stoffe) beschränkt.

Erst etwa 10 Jahre später begannen verschiedene Arbeitsgruppen das Verhalten von Eiweissspaltprodukten in der chromatographischen Säule zu studieren(226,232).

1941 schufen erstmalig M a r t i n, Go r d o n und S y n g e(137) die Grundlage für die Verteilungschromatographie, ein Verfahren zur Trennung von hydrophilen Stoffen, insbesondere von Aminosäuren. Sie wurden dafür mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

1944 verwendeten C o n s d e n, G o r d o n und M a r t i n(28) statt der Silicagel-Säulen des Synge'schen Verfahrens Papierstreifen. Damit war der erste Stein für die Aminosäurenuntersuchung gelegt. Mit dieser Methode wurde es erstmalig möglich, praktisch sämtliche in Proteinen vorkommende Aminosäuren qualitativ zu identifizieren.

S a n g e r(187- 191) gelang auf der Basis der Verteilungschromatographie die Endgruppenbestimmung in Proteinen, wodurch er die Aminosäurenfolge des Insulins (und damit war die erste Strukturanalyse eines menschlichen Proteins gemacht worden) aufklärte.

M o o r e und S t e i n (144) führten mit der Säulenchromatographie mittels Stärkegel quantitative Aminosäurenanalysen durch.

Das Ionenaustauscherverfahren, das durch die Engländer A d a m s uns H o l m e s (1) in die analytische Chemie Eingang fand, geht zurück auf ein längst bekanntes Naturphänomen, dem Ionenaustausch. Schon das alte Testament berichtet von einem Ionenaustauschverfahren zur Aufbereitung von Trinkwasser. So kann man bei Moses im 2. Buch lesen : (148)

....."Da kamen sie gen Mara; aber sie konnten das Wasser zu

Mara nicht trinken,denn es war sehr bitter.Daher hieß man den Ort Mara.Da murrte das Volk wider Mose und sprach: Was sollen wir trinken?Er schrie zu dem Herrn,und der Herr wies ihm einen Baum;den tat er ins Wasser,da ward es süß....."

Ebenso vor unsere Zeitrechnung dadiert die Erkenntnis von A r i s t o t e l e s (6),daß Seewasser einen Teil seines Salzgehaltes beim Passieren einiger Gesteinsschichten verliert. T h o m p s o n und W a y ($\frac{223}{237}$) berichteten im Jahre 185o über die Fähigkeit des Ackerbodens verschiedene Ionen wie Ammonium- gegen Calzium- oder Magnesium-Ionen auszutauschen.Diese Erscheinung wurde als Basenaustausch bezeichnet.
Erst H e n n e b e r g und S t o h m a n n (96) gelang die richtige chemische Deutung dieser Vorgänge.L e m b e r g(126) konnte 187o zeigen,daß Tone,Grünsande und Zeolithe für diese Vorgänge verantwortlich sind und daß eine Reihe natürlicher Mineralien die Fähigkeit zum Ionenaustausch besitzen.
Synthetische Ionenaustauscher auf anorganischer Basis wurden zuerst von H a r m s und R ü m p l e r 19o3(89) und dann von G a n s 19o5(67,68)hergestellt.
Die Beobachtung,daß zermahlene Gramophonplatten(Kunstharze) ionenaustauschende Eigenschaften besitzen,führte zur Synthese von Kunstharzaustauschern durch A d a m s und H o l m e s(1). Es wurden Kunstharze synthetisch hergestellt,die eine weit grössere Leistungsfähigkeit hatten als die bislang bekannten anorganischen Austauscher.Die Polykondensationsharze wurden durch Polymerisationsharze,die bei weitem grössere Bedeutung besitzen,abgelöst.In beiden Gruppen gibt es Kationen und Anio=

denaustauscher.Die weitere Entwicklung,die besonders von zahlreichen chemischen Fabriken vorangetrieben wurde,bemühte sich um die Verbesserung verschiedener Ionenaustauschharze und um die Herstellung von Spezialharzen mit spezifischer Wirkung. Gleichzeitig mit der weiten Verbreitung der Kunstharzionenaustauscher in der Chemie und Technik vermehrte sich die wissenschaftliche Literatur über Ionenaustausch.(Abb. 1)
Die zunächst rein empirisch durchgeführten Versuche fanden in jüngster Zeit ihre theoretischen Grundlagen.
Nach dem grossen Fortschritt in der Entwicklung der synthetischen Kunstharzaustauscher lag der Gedanke nahe,Austauscher auch in der Proteinchemie zu verwenden.So baute P a r t r i d g e(152) die Verdrängungsanalyse und M o o r e und S t e i n(145) die Elutionsanalyse an Austauschharzen zu einer leistungsfähigen Methode zur Isolierung von Aminosäuren aus Hydrolysaten aus. Ermutigt durch die Erfolge bei der chromatographischen Trennung der Aminosäuren,Peptide,Lipide,Zucker und vieler anderer Substanzen wurden viele Versuche unternommen,Proteine in ihrem nativen Zustand auch chromatographisch zu trennen.Die chromatographische Untersuchung der Proteine hatte jedoch anfänglich nicht den großen Erfolg zu verzeichnen,wie die kleinerer einfacherer Moleküle.Die Größe des Proteinmoleküls verhindert seine Penetration in die Teilchen des Adsorbans,sodaß nur die nach aussen gerichteten "Exogruppen" des Ionenaustauschers belegt werden können.Damit ist schon gesagt,daß zur Erhöhung der Adsorptionskapazität eine sehr feine Verteilung des Adsorbens notwendig ist.Andererseits stieß man bei der Wahl der Elutionslösung schon deswegen auf Schwierigkeiten,da das Proteinmolekül ein unstabiles Molekül darstellt,das bei leichter Veränderung des

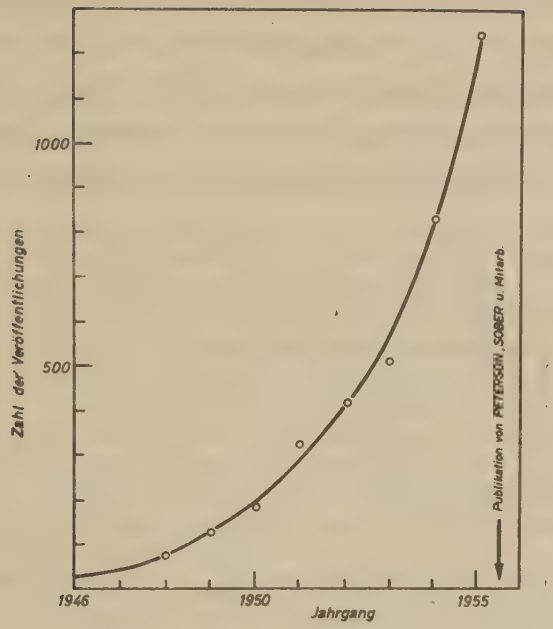


Abbildung 1

Zunahme der Zahl der Publikationen säulenchromatographischer Arbeiten(94)

Milieus zersetzt werden kann.Außerdem mußte man auch die Wechsel=wirkungen zwischen dem Adsorbens und dem Proteinmolekül bei den adsorptiven und desorptiven Prozeßen in Betracht ziehen.
Maßgebend für die Entwicklung der Chromatographie in der Protein=chemie war die Erkenntnis,daß der Bereich der Bedingungen in dem(im Hinblick auf pH und Salzkonzentration) eine Adsorption und Desorption stattfinden kann,sehr klein ist.Bei abnehmender Salzkonzentration nimmt die Adsorption zu,während desorptive Vorgänge bei steigender Salzkonzentration begünstigt werden.

In den letzten 12 Jahren haben sich verschiedene Arbeitsgruppen um die Auswahl eines für die chromatographische Untersuchung der Proteine geeigneten Adsorbens bemüht (143,2o9,247).
So gelang es 1951 die Reinigung von Ribonuclease,einem relativ stabilen Protein von ziemlich niedrigem Molekulargewicht und hohem isoelektrischen Punkt,mittels Ionenaustausch an einer Carboxylharzsäule(IRC 5o) vorzunehmen.Letztere stellt einen schwachen Kationenaustauscher dar($\frac{100}{221}$).Die Trennung der Carboxylhämoglobine von Foeten des Schafes und vom Rind wurden ebenfalls an einer IRC 5o-Säule von B o a r d m a n und P a r = t r i d g e (13) 1953 durchgeführt.
S o b e r, K e g e l e s und G u t t e r (212) führten die Tren=nung der Proteine der Albuminfraktion aus Eiklar am Austauscher=harz Dowex 5o,einem Sulfosäureharz,durch.Die Kapazität dieses starken Kationenaustauschers war für die Serumproteinanalyse zu gering(211).
Es wurden außerdem als Adsorbens verwandt Dowex-2,ein Anionen=austauscher (16) und anorganische Gele wie Calziumphosphat(22o).
Jedoch waren immer noch Adsorbentien mit größerer chemischer

und physikalischer Stabilität sowie größerer Kapazität erwünscht.

Die Einführung der Cellulose-Austauscher durch S o b e r und P e t e r s o n (154) 1956 bedeutete den Anfang einer völlig neuen Ära der präparativen und analytischen Protein-Methodik. Zwar wurde Cellulose,Papierpulverkolonnen ($\frac{80}{105}$) und Rundfilterkolonnen (142),wie auch Filterpapier (173) zur Trennung verschiedener Ferment= und Hormon-Proteine schon früher mit Erfolg angewandt.Diese Ferment= und Hormon-Proteine besaßen jedoch im Vergleich zu Plasmaproteinen größere Stabilität. Die Papierchromatographischen Trennversuche von Plasmaproteinen und anderen Eiweissstoffen war nicht befriedigend.
B r a n d e n b e r g e r (18) untersuchte sowohl Plasma, Serum,wie auch nach der Alkoholfällungsmethode von C o h n und Mitarbeiter(———) erhaltene Plasmafraktionen chromatographisch mittels Cellulosepuder.Er konnte feststellen,daß

Fibrinogen von der Cellulose zurückgehalten wird und schwer eluierbar ist,

Serumalbumin,sowie das α_1-Glykoprotein mit der Lösungsfront quantitativ und ohne jede Verzögerung durchläuft,

die nach dem Alkohol- und Salz-Verfahren gewonnenen γ-Globulinfraktionen sich bezüglich Adsorption an Cellulose nicht homogen verhalten.

Ein Anteil der γ-Globulinfraktionen soll wie die in der zweiten Gruppe erwähnten Proteine ohne jede Verzögerung durchlaufen, und der andere Teil soll an der Auftragsstelle zurückbleiben. Wie schon erwähnt,verwendete er als Adsorbens Cellulosepulver, das bekanntlich nur eine geringe Anzahl von Carboxylgruppen mit

Ionenaustauschereigenschaften besitzt. Das Durchlaufen fast aller Proteine mit der Lösungsmittelfront-außer Fibrinogen- an diesen Cellulose-Kolonnen ist außerdem auf die Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung sowie verschiedener Puffer als Elutionsmittel mit großer Ionenstärke zurückzuführen.

Durch die Einführung verschiedener Ankergruppen an der Cellulose konnte man die Ionenaustauschereigenschaften erhöhen. Solche substituierten Cellulose(Carboxylmethyl-,Diaethylaminoaethylcellulosen usw.) wurden zur Reindarstellung von Enzymen und anderen Proteinen mit Erfolg angewendet (153,213,215). Richtungsgebend für die weitere Entwicklung in der Fraktionierung von Serumproteinen an Anionenaustauschcellulose waren die geradezu klassisch gewordenen Arbeiten von P e t e r s o n und S o b e r sowie S o b e r, G u t t e r, W y c k o f f und P e t e r s o n im Journal of Chemical Society im Jahre 1956 ($\frac{154}{210}$).In diesen beiden Arbeiten sind die Methoden zur Zubereitung für verschiedene substituierte Cellulosen ,sowie das Grundsätzliche über die Verfahren der Elutionschromatographie der Serumproteine mit diesen Cellulosearten beschrieben.

Die Säulenchromatographie fand auf den verschiedensten Gebieten der Eiweißchemie Verwendung,sowohl zur Isolierung, als auch zur Vor- und Nach-Reinigung der einzelnen Fraktionen in Kombination mit anderen Methoden.

In der vorliegenden Arbeit wird nach einer kurzen Darstellung verschiedener säulenchromatographischer Verfahren speziell auf die Gradientenelutionschromatographie an Ionenaustauschern und auf ihre Brauchbarkeit eingegangen.Anschließend wird über säulenchromatographische Untersuchungen an einer großen Zahl

von paraproteinämischen Seren berichtet und die Möglichkeit der Isolierung der Paraproteine von dem ihm antigenetisch verwandten Immunglobulin (z.B. im Falle der IgG-Paraproteinämie - das normale IgG vom pathologischen IgG). An Hand verschiedener Elutionsmuster wird auf das unterschiedliche Verhalten des Paraproteins vom gleichen oder unterschiedlichen Typ bei der Gradientenelutionschromatographie hingewiesen. Diese Eigenschaft stellt neben verschiedenen physico-chemischen und immunologischen Eigenschaften ein neues Charakteristikum der Paraproteine dar, welche zu ihrer Isolierung und Reindarstellung verwendet werden kann.

Einführung in die Chromatographie

Der Begriff Chromatographie geht,wie schon erwähnt,auf den Botaniker T s w e t t (229) 1906 zurück,und wurde anfänglich für Adsorptionsanalyse verwendet.Er beruht auf der Tatsache, daß Farbstoffgemische auf Grund ihrer verschiedenen Affinität zum Adsorptionsmittel sich in ihre einzelnen Komponenten zerlegen,die dann durch verschiedene Farbstoffzonen zu erkennen sind.Stoffe mit größerer Affinität werden vom Adsorptionsmittel festgehalten und wandern langsamer als Stoffe mit kleinerer Affinität,sodaß sich die einzelnen Stoffe an bestimmten Stellen durch Bindung an das Adsorptionsmittel anreichern.Durch Nachwaschen mit geeigneten Lösungsmitteln kann man die Zonen in genügend weitem Abstand erhalten(Entwickeln des Chromatogramms). Später wurde der Begriff Chromatographie auf sämtliche andere Trennmethoden ausgedehnt,bei denen die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Stoffe auf dem Trägermaterial zu ihrer Trennung benutzt wurde.Die Ursache dieser selektiven Verzögerung kann auf Adsorption,Ionenaustausch oder Verteilung beruhen.
Hier kann nur ein Überblick über die Arten und Grundprinzipien der säulenchromatographischen Untersuchungen gegeben werden.

Adsorptionschromatographie

Die Trennung der einzelnen Komponenten eines Gemisches bei der Adsorptionschromatographie beruht auf einer unterschiedlichen Affinität der zu untersuchenden Stoffe zum Adsorbens. Ausschlaggebend für die Adsorbierbarkeit eines Stoffes ist der strukturelle Aufbau seines Moleküls.

Eine Zusammenstellung der Beziehungen zwischen strukturellem Unterschied und der Trennbarkeit im Adsorptions-,Ionenaustausch-, und Verteilungs-Chromatogramm zeigt Tabelle 1.
Technisch geht man so vor,daß man auf eine mit einem Adsorbens gefüllte Säule das zu trennende Substanzgemisch ,das in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst ist,aufgibt und hindurchlaufen läßt.Am oberen Ende der Säule werden diejenigen Stoffe mit größerer Affinität zum benützten Adsorbens adsorbiert; es folgt dann nach unten zu der nächste Stoff mit geringerer Affinität usw.Die Eluierung kann durch Verwendung stark polarer Lösungsmittel beschleunigt werden.Die so entstandenen Zonen werden dann mit geeigneten Methoden identifiziert und nach der erwünschten Weise verarbeitet.Als Adsorbens werden verschiedene Stoffe wie Aluminiumoxyd,Aktivkohle,Kieselsäuregel,Calciumcarbonat usw. verwendet.

Verteilungschromatographie

Die Technik der Verteilungschromatographie ist der der Adsorptionschromatographie sehr ähnlich.Die Trennung in die einzelnen Zonen erfolgt hierbei jedoch nicht nach einer unterschiedlichen Affinität zum Adsorbens - sondern beruht auf den verschiedenen Verteilungskoeffizienten der einzelnen Stoffe in zwei nicht vollständig miteinander mischbaren Lösungsmitteln. Jedoch ist die Grenze zwischen Verteilung und Adsorption in vielen Fällen nicht scharf zu ziehen.Wasserstoffbindungen, van der Waal'sche Kräfte sowie Ionenbindungen zwischen den Molekülen der Lösungsmittel und der zu verteilenden Substanzen sind maßgebend für den Verteilungskoeffizienten.Technisch geht man bei der Verteilungschromatographie so vor,daß das in der

Strukturelle Unterschiede	Adsorption	Trennung Ionenaustausch	Verteilung
Molekülgrösse	+ bis (+)	+ bis ++	+ bis ++
Strukturisomere			
Ketten, Ringe	+ bis (+)	-	+
Kettenverzweigung	+ bis (+)	(+)	(+)
Lage von Doppelbindungen	+ bis (+)	-	-
Räumliche Isomere			
cis-trans an Doppelbindung	+ bis (+)	+	+
cis-trans am Ring	++ bis (+)	+	+
Optische Isomere	(+)	+ bis (+)	(+)
Zahl der Doppelbindungen	++	-	+
Konjugation der Doppelbindungen	++ bis +	+	+
Zahl unpolarer Substituenten	+ bis (+)	+ bis (+)	+ bis (+)
Zahl polarer Substituenten	++	++	++
Polarität der Substituenten	++	++	++

Beziehung zwischen strukturellem Unterschied und der Trennbarkeit im Adsorptions-, Ionenaustausch- und Verteilungschromatogramm.

Aus: Turba, F. : "Chromatographische Methoden in der Proteinchemie" Springer Verlag 1954

++ sehr gut, + gut, (+) mässig, - nicht untersucht

Tabelle 1

Säule befindliche Adsorbens vorher mit einem Lösungsmittel beladen wird,das von dem des Substanzgemisches verschieden ist. Das Adsorbens dient hier nur als Trägerstoff für die beiden flüssigen Phasen.Meist verwendet man speziell hergestelltes Kieselgel für verschiedene Formen der Verteilungschromatogra= phie.

Die Papierchromatographie ist vorwiegend eine Verteilungschro= matographie.Das Filterpapier dient hier als Träger sowohl für die unbewegliche Phase als auch für das bewegliche Lösungsmittel.

2.1.3 Molekularsiebeffekt

Bei diesem Verfahren wird die unterschiedliche Molekulargröße der verschiedenen Stoffe zu ihrer Trennung benutzt.Als solche "Molekularsiebe"wurden zuerst synthetische Silikate von Zeolit= struktur benützt.In Abhängigkeit von dem Durchmesser der "Poren", die in einem solchen Zeolitgitter vorhanden sind,können Moleküle,welche kleiner als diese sind unter Bildung einer sogenannten "Käfigeinschlußverbindung"gebunden werden.So werden jene kleineren Moleküle von den größeren,die nicht in die Poren eindringen können, getrennt.In letzter Zeit hat Sephadex,ein modifiziertes Dextran bakteriellen Ursprungs,als organisches Gegenstück zu den bishe= rigen Molekularsieben weitgehend Eingang in die säulenchromato= graphische Methodik gefunden.Diese Art der Chromatographie wurde Gelfiltration genannt.Bei diesem Verfahren werden die Moleküle, die größer sind als die Poren des verwendeten Sephadex an den Gelkörnern vorbeiwandern.Sie verlassen die Säule zuerst.Die kleineren Moleküle können je nach ihrer Größe mehr oder weniger die Gelkörner durchdringen.Je kleiner also die Moleküle sind,umso mehr wird ihre Wanderung durch die Säule verzögert.Sie erscheinen

im Eluat in der Reihenfolge der abnehmenden Molekulargröße.Es gibt verschiedene Typen von Sephadex,die für unterschiedliche Molekülgrößen(im allgemeinen entsprechen die Molekülgrößen auch den Molekulargewichten)zugänglich sind.Zur chromatographischen Untersuchung der Plasmaproteine eignet sich am besten Sephadex G-loo und G-2oo mit einer Ausschlußgrenze von loo ooo bzw. 2oo ooo.Eine ausführliche Beschreibung der Gelfiltration,ihre Theorie und Anwendung findet sich bei F l o d i n (59).

2.1.4 Elektrochromatographie

Bei der Elektrochromatographie wird die chromatographische Trennung in einem elektrischen Feld vorgenommen.Die Hauptaufgabe der Säulenfüllung besteht im Tragen eines aufgegebenen Puffers ohne Gefahr einer Konvektion.Maßgebend für die Trennung ist bei diesem Verfahren die unterschiedliche Ladung der einzelnen Komponenten.Somit ist das Verfahren nur auf jonogene Verbindungen beschränkt.
Über quasikontinuierliche Elektrophoresesäulen siehe bei P o r a t h(161).

2.1.5 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine flüssig-feste Chromatographie.Der Ionenaustauscher bildet hierbei die feste Phase. Die Trennung verschiedener Stoffe beruht auf der verschiedenen Affinität der Ionen zum Ionenaustauschermaterial bzw. der Selektivität des Ionenaustauschers zu den Ionen des Substanzgemisches. Es tritt ein Austausch der Anionen oder Kationen der Lösung mit denen des Austauschers ein.Hierdurch wird eine Anreicherung der einen oder der anderen Komponenten des Untersuchungsstoffes erreicht.

In der Durchführung hat die Ionenaustauschchromatographie große Ähnlichkeit mit der Adsorptionschromatographie,ist jedoch von dieser grundsätzlich verschieden,obwohl zwischen beiden Vorgängen keine scharfe Grenze zu ziehen ist.Es sei noch angeführt, daß M a r t i n ($^{136}_{137}$) die Austauschchromatographie als eine Art von Verteilungschromatographie betrachtet,nachdem er alle chromatographischen Verfahren an Säulen mit beliebigem Füllmaterial,welches mit der Lösung verquillt,als Verteilungschromatographie bezeichnet.Die Grundzüge und Arten der Ionenaustauschchromatographie sowie ihrer Trägerstoffe,die Ionenaustauscher, speziell die substituierten Cellulosen,sollen noch genauer besprochen werden.

2.1.5.1 Grundzüge der Ionenaustauschchromatographie

Das Ionenaustauschverfahren basiert auf der Eigenschaft bestimmter Stoffe,den Ionenaustauschern,ihre heteropolar gebundenen Ionen gegen Ionen gleicher Ladung aus dem umgebenden Medium auszutauschen.Ein so gebundenes Ion kann wiederum durch ein anders Ion gleichen Vorzeichens ausgetauscht werden.Der Vorgang ist reversibel und läuft stöchiometrisch ab:für jedes Äquivalent eines Ions,das der Austauscher an die Lösung abgibt, nimmt er ein Äquivalent eines Ions gleichen Vorzeichens vom umgebenden Medium auf.Damit ist auch gesagt,daß man bei der Ionenaustauschchromatographie mit einem reinen Lösungsmittel nicht alle Gegenionen auswaschen kann und immer ein Elektrolyt benötigt wird.

Je nachdem,ob ein Austauscher zu Kationen-oder Anionenaustausch befähigt ist,wird er als Kationen- oder Anionenaustauscher bezeichnet.Es gibt jedoch auch polyfunktionelle bzw. amphotere Ionenaustauscher,die sowohl Anionen als auch Kationen austauschen können.Die unterschiedliche Selektivität

des Austauschers für verschiedene Ionen wird beim chromatogra=phischen Verfahren zur Trennung verwandter Ionen ausgenützt. Je größer der Unterschied der Selektivität des Austauschers für zwei Stoffe ist,umso besser gelingt ihre Trennung mittels Austausch=chromatographie.

Im Gegensatz zur Adsorptionschromatographie folgt das Ionenaus=tauschverfahren nicht der L a n g m u i r und F r e u n d l i c h = 'schen Adsorptionsisotherme sondern beruht,wie schon angeführt, auf einem stöchiometrischen Austausch von Ionen.Bei der reinen Adsorption nimmt das Adsorptionsmittel einen gelösten Stoff auf, ohne einen anderen dafür abzugeben.

Es ist noch einmal zu betonen,daß man keine scharfe Grenze zwi=schen beiden Verfahren ziehen kann,zumal beide Vorgänge nebenein=ander ablaufen können und fast jeder Ionenaustausch von einer Adsorption begleitet ist.Andererseits sind die meisten Adsorp=tionsmittel zum Ionenaustausch befähigt.

Die Vorgänge bei einem Anionenaustausch könnte man wie folgt formulieren :

$$\underline{M^+GI^-} + AI^-R^+ \longrightarrow \underline{M^+AI^-} + GI^-R^+$$

indem M^+ eine beliebige Matrix eines Anionenaustauschers mit positiv geladenen Ankergruppen,GI^- das negativ geladene Gegen=ion und AI^- das auszutauschende Ion darstellt.

Wenn der Austauscher als Hydroxylform und das auszutauschende Ion in der H^+-Form vorliegt,dann ist der Ionenaustausch ein der Neutralisation analoger Vorgang :

$$\underline{M^+OH^-} + AI^-H^+ \longrightarrow \underline{M^+AI^-} + H_2O$$

Analog zu den Vorgängen beim Anionenaustauscher kommt man beim Kationenaustausch zu folgenden Formulierungen :

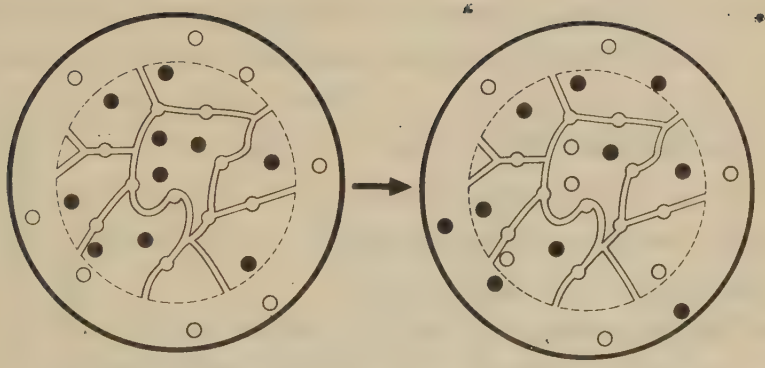
$$\underline{M^-GI^+} + AI^+R^- \rightleftharpoons \underline{M^-AI^+} + GI^+R^-$$

Wenn der Austauscher als H^+ - Form und das auszutauschende Ion in der Hydroxylform vorliegt,wird hier auch der Ionenaustausch ein der Neutralisation analoger Vorgang.

$$\underline{M^-H^+} + AI^+OH^- \rightleftharpoons \underline{M^-AI^+} + H_2O$$

Damit diese Ionenaustauschvorgänge in der Austauschersäule ablaufen können,ist ein vermittelndes Agens notwendig,in dem die auszutauschenden Ionen gelöst sind.Dieses Medium ist im allgemeinen Wasser,das bei gequollenem Ionenaustauscher in seinen Poren enthalten ist.Die in diesem Medium gelösten Ionen können in die "Poren" diffundieren,mit den Gegenionen des Austauschers ihren Platz tauschen und sich den vorhin eingedrungenen Coionen zugesellen,sodaß immer die Elektronenneutralität erhalten bleibt. Nach einiger Zeit stellt sich ein Gleichgewicht (Ionenaustauschgleichgewicht)in dem System ein.Jetzt sind beide Ionenarten (Gegenionen des Austauschers und die auszutauschen Ionen der Lösung)in bestimmten Mengenverhältnissen sowohl im Austauscher als auch in der Lösung vorhanden.Zum besseren Verständnis der Vorgänge beim Ionenaustausch wird der Austauscher meist mit einem Schwamm verglichen.Das Grundgerüst des Schwammes entspricht dem hochmolekularen Gerüst des Austauschers(Matrix).An ihm sind sogenannte Ankergruppen fest und chemisch verbunden und werden auch als "Festionen" bezeichnet.Bei den Anionenaustauschern bestehen diese Ankergruppen aus Kationen,sie werden deswegen auch "Polykationen" genannt.Bei den Kationenaustauschern bestehen sie aus Anionen,und diese Austauscher werden auch "Polyanionen" genannt.Die Zwischenräume im Maschenwerk des hochmolekularen Gerüstes werden als "Poren" bezeichnet.In diesen

Poren bewegen sich die "Gegenionen",also Ionen,die die ent=gegengesetzte Ladung besitzen wie die Ankergruppen der Matrix. Die Überschußladung des Gerüstes wird durch diese heteropolar gebundenen Ionen neutralisiert.Die Gegenionen können nur dann den Schwamm(Matrix mit Ankergruppen) verlassen,wenn dafür zur Erhaltung der Elektronenneutralität andere Ionen mit gleicher Ladung hineindiffundieren können.Physikalisch chemisch gesehen ist der wichtigste Vorgang dabei die Diffusion,deren Geschwin=digkeit von der Beweglichkeit der Gegenionen abhängt;jedoch folgt sie nicht ganz dem einfachen F i c k ' s c h e n Gesetz.
Als Austauschkapazität bezeichnet man den Gehalt an austausch=fähigen Gegenionen.Sie ist von der Natur der Gegenionen unab=hängig und stellt eine Konstante des Austauschers dar(siehe auch unter Kapazität).
Die vorherige Formulierung des Ionenaustausches könnte man jetzt wie folgt schematisieren(Abb.2).
Der Ionenaustausch ist also kein rein chemischer Vorgang im üblichen Sinne.Als "Coionen" werden alle Ionensorten in dem System benannt,die das gleiche Vorzeichen haben,wie das Grund=gerüst des Austauschers.Diese beteiligen sich nicht an dem Austausch und sind im obigen Schema anschaulichkeitshalber nicht mit eingezeichnet.
Wie schon beschrieben,stellt sich nach einiger Zeit ein Gleich=gewicht zwischen Gegenionen des Austauschers und den auszutau=schenden Ionen der Lösung in beiden Medien ein(Ionenaustausch=gleichgewicht).
Die Vorgänge gestalten sich in einer Säule so : nach Aufgabe einer Lösung,die die auszutauschenden Ionen AI enthält,stellt sich bald ein Ionenaustauschgleichgewicht im oberen Teil der Austauscher=packung ein.



● *Gegenionen der Austauscher*, bei Kationenaustauschern positiv geladen, bei Anionenaustauschern negativ geladen
○ *Auszutauschende Ionen der Lösung*, bei Kationenaustauschern positiv geladen, bei Anionenaustauschern negativ geladen
Matrix mit Festionen, bei Kationenaustauschern negativ geladen, bei Anionenaustauschern positiv geladen.

Abbildung 2

Schematische Darstellung der Ionenaustauscher(Erklärung siehe Text)

Diese "Austauscherzone" verlagert sich mit der Zeit nach unten. Es werden immer mehr Gegenionen des Austauschers GI mit AI ausgetauscht.Die Lösung durchströmt auf ihrem Wege durch die Säule ständig neue Schichten von unverbrauchtem Austauschermaterial und das Gleichgewicht verschiebt sich immer mehr nach der gewünschten Richtung.Es tritt als erstes solange reines GI aus der Säule aus bis die Packung erschöpft bzw. die Austauscherzone am Ende der Säule angelangt ist.Jetzt treten auch die AI mit den GI aus der Säule aus.Von jetzt an vermehrt sich der Anteil der AI im Durchlauf bis schliesslich nur noch AI,und zwar in derselben Konzentration wie sie ursprünglich auf die Säule gegeben worden ist,aus der Säule austritt.

Das Aufnahmevermögen bis zum "Durchbruch" für AI wird als "Durchbruchskapazität" bezeichnet,die natürlich von der Gesamtkapazität verschieden ist(siehe Abschnitt über Kapazität).

Je näher die Durchbruchskapazität der Gesamtkapazität ist,umso größer ist der "Ausnutzungsgrad".

Wenn man die Konzentration der auszutauschenden Ionen der Lösung im Ablauf der Säule (Ordinate) gegen das Ablaufvolumen (Abszisse) aufträgt,bekommt man eine Kurve,die Elutionskurve bzw.Austauschisoplane genannt wird(Abb.3).Die rechteckige Fläche(links) bis zum Durchbruch entspricht der Durchbruchskapazität;die Gesamtkapazität ist die ganze,von der Ordinate und der Kurve begrenzte Fläche.

Die Schärfe der "Fronten" und damit auch der Ausnutzungsgrad bei der Austauscherpackung hängt von verschiedenen Faktoren ab,die hier kurz erwähnt und bei dem entsprechenden Kapitel ausführlich besprochen werden:Unterschiedliche Selektivität des Austauschers

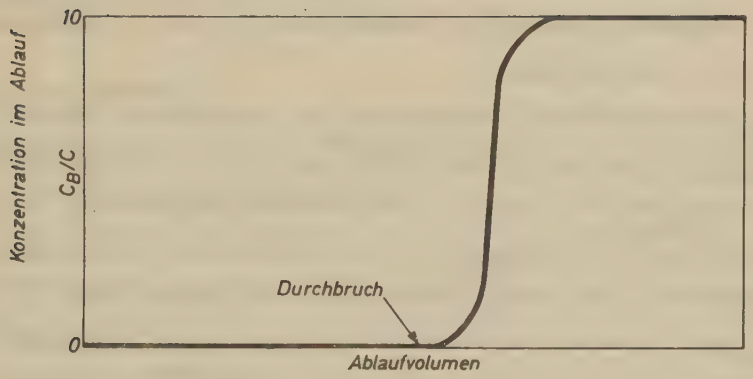


Abbildung 3

Schematische Darstellung der Elutionskurve (Austauschisoplane) für den Ionenaustausch in einer Säule.
Aufgetragen ist die Konzentration von B im Ablauf gegen das Lösungsvolumen, das durch die Säule geflossen ist. Die Durchbruchkapazität (in Einheiten C) entspricht der rechteckigen Fläche bis zum Durchbruch, die Gesamtkapazität der ganzen von der Ordinate und der Kurve begrenzten Fläche (94).

für Ionen der Lösung und die Gegenionen des Austauschers,voll= ständige Gleichgewichtslage des Ionenaustauschers,höhere Aus= tauschgeschwindigkeit gegenüber der Strömungsgeschwindigkeit, feine gleichmäßige Körnung des Austauschers ,Herabsetzung der Longidutinaldiffusion,günstige Dimensionen der Säule,hohe Tem= peratur und die günstige Konzentration der zu untersuchenden Lösung begünstigen die Schärfe der Fronten und damit auch den Ausnutzungsgrad.Es muß jedoch erwähnt werden,daß diese Faktoren sich gegenseitig sowohl in erwünschter,als auch in unerwünsch= ter Weise beeinflussen.

Die unterschiedliche Selektivität des Austauschers bzw.das un= terschiedliche Austauschpotential von Kationen an Kationenaus= tauschern und von Anionen an Anionenaustauschern wird in der Ionenaustauschchromatographie zur Trennung der verschiedenen Komponenten einer Lösung benützt.Der Austauscher nimmt sozusagen bestimmte Ionen mit Vorliebe.So wie diese Ionen ausgewählt auf= genommen werden,verdrängen sie sich gegenseitig in der Reihenfolge ihrer Selektivität.Diese Vorgänge wiederholen sich in einer Austauscherpackung Schicht für Schicht,dabei verschiebt sich die Gleichgewichtslage in der gewünschten Weise und die Trennung wird immer vollkommener,bis schließlich das Säulenende erreicht ist.Jetzt erscheinen die einzelnen Komponenten der Lösung in der Reihenfolge ihrer Selektivität und zwar diejenige mit der geringsten Selektivität als erste und diejenige mit der größten als letzte.Je nachdem,wie man diese chromatographische Trennung in einer Säule durchführt,unterscheidet man:

1. Frontenanalyse
2. Verdrängungschromatographie
3. Elutionschromatographie,

die im einzelnen besprochen werden sollen.

Wie beim einfachen Ionenaustausch ist die Schärfe der Fronten in allen der benannten Methoden abhängig von der Selektivität des Austauschermaterials,dem Verhältnis zwischen Austauschgeschwindigkeit und Durchflussgeschwindigkeit,den Dimensionen der Säule,der Korngröße und ihrer Gleichmäßigkeit,der Packung der Säule und schließlich von der Temperatur.Wir werden auf diese Faktoren und ihren Einfluss auf die Trennung bei den entsprechenden Abschnitten zurückkommen.

2.1.5.2 Frontenanalyse

Frontenanalyse,auch Frontalchromatographie genannt,ist die einfachste Art der Ionenaustauschchromatographie.Der Name ist in Anlehnung an die Terminologie der einfachen Adsorptionschromatographie gewählt worden.Bei diesem Verfahren wird die Lösung,die die zu trennenden Komponenten enthält,am oberen Ende der Säule kontinuierlich und gleichmäßig aufgegeben.Nach der steigenden Selektivität trennen sich die Komponenten und bilden die sogenannten "Fronten",die bei farbgebenden Komponenten an der Säule sichtbar sind.Beim Durchwandern der Säule werden die Ionen mit geringerer Selektivität von denen mit größerer Selektivität und diese wiederum von denen mit noch größerer Selektivität usw.verdrängt.So treten die Ionen des Gemisches als erste aus der Säule,die die geringste Selektivität besitzen.Als zweite erscheint die Komponente mit nächst größerer Selektivität,jedoch immer mit Beimengung der ersten,da von oben noch kontinuierlich zugegeben wird. Die dritte Front enthält somit auch die Komponenten der ersten und zweiten Front.Wenn die Säule erschöpft ist,fließt die Lösung ohne Änderung ihrer Zusammensetzung durch die Säule und erscheint im Eluat.

Man erhält mit diesem Verfahren nur eine reine Fraktion und zwar diejenige,die die geringste Affinität zum Austauscher besitzt. Alle anderen Fraktionen enthalten mehrere Komponenten,in Abwesenheit des einen oder anderen Bestandteils des Gemisches. Das gewonnene Chromatogramm ist treppenförmig.Wir haben diese Methode zur Analyse der Serumproteine verwendet.Es sei erwähnt, daß mit diesem Verfahren eine Reingewinnung der Gammaglobuline und eine Anreicherung des Coeruloplasmins möglich ist.

2.1.5.3 Verdrängungsanalyse

Bei dieser Methode wird die zu untersuchende Lösung am Kopfe der Säule aufgegeben.Nachdem die Lösung in die Packung eingesickert ist,wird mit einer Elektrolytlösung,für deren Ionen der Austauscher die größere Selektivität besitzt,eluiert.Somit werden alle anderen Ionen in Abhängigkeit ihrer Selektivität unterschiedlich von den Ionen des Eluens verdrängt.Die einzelnen Komponenten der Lösung bleiben mehr oder weniger stark am Austauscher hängen und verdrängen sich ebenfalls gegenseitig. Auf ihrer Wanderung durch die Packung bilden sich somit selbst schärfende Fronten.Diese laufen mit der gleichen Geschwindigkeit durch die Säule und erscheinen in der Reihenfolge ihrer Selektivität unmittelbar aufeinander im Eluat.Die Banden überschneiden sich im Chromatogramm.Man gewinnt mit diesem Verfahren reine und gemischte Fraktionen,wobei letztere zwei benachbarte Komponenten enthalten(Überschneidungsstelle im Chromatogramm).Soweit uns bekannt,ist dieses Verfahren noch nicht zur Untersuchung der Serumproteine herangezogen worden.

2.1.5.4 Elutionschromatographie

Bei der Elutionschromatographie wird genau wie bei den vorigen Verfahren das zu trennende Gemisch am Kopf der Säule aufgetragen. Zwischen den Ionen des Gemisches und den Gegenionen des Austauschers findet ein Austausch statt.Anschließend wird mit einem Eluens,das die ursprünglichen Gegenionen des Austauschers enthält,eluiert.Die Ionen des Eluens besitzen gegenüber den Ionen der zu untersuchenden Lösung,im Gegensatz zur Verdrängungschromatographie,eine gringere Selektivität zum Austauscher.Auf Grund geringerer Selektivität überholen die Ionen des Elutionsmittels die zu trennenden Ionen.Trotzdem findet im Verlauf der Elution, bedingt durch ein ständiges Nachfließen des Elutionsmittels,ein Austausch statt,und die gesamten Ionen des Gemisches werden durch die Ionen des Eluens ersetzt,erstere wandern nach unten. Bedingt durch die unterschiedliche Haftfähigkeit der Ionen am Austauscher trennt sich die zu untersuchende Lösung im Verlauf ihrer Wanderung durch die Säule in einzelne Banden auf.Diese laufen im Gegensatz zur Verdrängungschromatographie mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Säule.Somit vergrößert sich im Verlauf der Elution der Abschnitt zwischen den einzelnen Banden,sodaß in einzelnen Zwischenzonen - wenn die Unterschiede in der Haftfähigkeit genug groß sind- nur die Ionen des Eluens vorhanden sind.Die Banden verbreitern sich allmählich und wandern nach unten.Die einzelnen Komponenten treten getrennt,jedoch immer mit den Ionen des Elutionsmittels aus der Säule aus.Zwischen den einzelnen chromatographischen Zacken liegen mehr oder minder lange Zwischenzonen,die nur die Ionen des Elutionsmittels enthalten.Die einzelnen chromatographischen Zacken können sowohl reine als auch gemischte Fraktionen bzw. Ionen enthalten.Bei den gemischten Fraktionen handelt es sich um Ionen mit fast gleicher Selektivität.Die Versuchsbedingungen müssen so gewählt wer-

den,daß einerseits die Überschneidungen so weit als möglich vermieden werden,andererseits die ein elnen Banden nicht soweit auseinander zu liegen kommen,da bei zu großem Abstand zwischen den einzelnen Banden ein großer Arbeitsaufwand und eine große Elutionsmittelmenge notwendig ist.Leider besitzen mehrere Komponenten der Serumproteine die gleiche Selektivität,sodaß eine chromatographische Trennung dieser Fraktionen nicht möglich erscheint.

2.1.5.5 Gradientenelutionschromatographie

Die Gradientenelutionschromatographie ist eine Variante der Elutionschromatographie,die zunächst für die Adsorptionschromatographie verwendet wurde.Später wurde sie jedoch in die Ionenaustauschchromatographie eingeführt.Bei diesem Verfahren wird die Zusammensetzung des Eluens im Laufe des Versuches kontinuierlich oder stufenweise verändert.Die Bezeichnung Gradient und Gradientenelution wurde bereits 1949 von M i t t c h e l und Mitarbeiter(142) in die Chromatographie eingeführt.Die allgemeine Grundlage dieser Methode wurde jedoch erst später von A l m und W i l l i a m s und T i s e l i u s (2,3) ausführlich behandelt und wie schon erwähnt,von vielen anderen Autoren auf Ionenaustauschchromatographie übertragen.

Das Prinzip dieser Methode besteht in der Verwendung eines im Laufe des Versuchs sich verändernden Eluens.Die Änderung geschieht kontinuierlich oder stufenweise und wird in einer Apparatur außerhalb der Trennsäule erzeugt(siehe auch Seite 56).Durch eine stetig sich ändernde Elutionskraft wird eine Verminderung des Zeitaufwandes und der Elutionsmittelmenge,eine Verhinderung zu

großer Verdünnung der eluierten Komponenten,eine Verringerung der Schwanzbildung und somit eine bessere Trennung erreicht.
Es dürfen jedoch die Komponenten nicht so nahe zusammengedrängt werden,daß eine Vermischung auftritt.Bei der Ionenaustauschchromatographie unterscheidet man zwischen einem Konzentrationsgradienten und einem pH-Gradienten.Es kann auch gleichzeitig ein Gradient verwendet werden,der sowohl seine Ionenstärke(Konzentration) als auch sein pH ändert.
Als pH-Gradienten kann man sowohl einen ansteigenden(vom sauren Bereich nach alkalisch) als auch einen fallenden(vom alkalischen Bereich nach dem sauren) auswählen.Nach der Form des Gradienten selbst unterscheidet man einen linearen,bei dem die Veränderung konstant,einen konkaven,bei dem die Veränderung zuerst langsam und dann immer schneller,und einen konvexen,bei dem die Veränderung zuerst schnell und dann immer langsamer verläuft.
Die ausführliche Beschreibung der Gradientenelutionschromatographie und ihre apparative Anordnung speziell in der Serumproteinanalyse wird später beschrieben.

2.2 T R Ä G E R S T O F F E

Ionenaustauschmaterialien sind feste und im Wasser unlösliche Stoffe,die aus ihrem umgebenden Medium Ionen mit positivem oder negativem Vorzeichen aufnehmen und dafür eine äquivalente Menge ihrer gebundenen Ionen gleicher Ladung abgeben.Der Vorgang ist, wie schon erwähnt,reversibel und verläuft stöchiometrisch.Je nach dem,ob sie zu Kationen- oder Anionen-Austausch befähigt sind, werden sie Kationen- bzw. Anionenaustauscher genannt.Diese Befähigung zum Ionenaustausch liegt in der Struktur des Austauschers

begründet.Diese Stoffe bestehen aus einem dreidimensionalen Gerüst,das durch Valenz oder Gitterkräfte zusammengehalten wird.Das Gerüst trägt eine Überschußladung,die bei Kationen-austauschern negativ und bei Anionenaustauschern positiv ist; deswegen werden sie auch Polykationen bzw.Polyanionen genannt. Diese Überschußladung des Gerüstes(Matrix) wird durch Ionen entgegengesetzter Ladung(Gegenionen) kompensiert.Diese Gegen-ionen sind heteropolar gebunden und können gegen Ionen gleichen Vorzeichens ausgetauscht werden.

Der Ionenaustausch ist ein Diffusionsvorgang,dessen Geschwin-digkeit von der Beweglichkeit der Gegenionen abhängt.Die Vor-aussetzung des Austauschers ist somit die Bewegungsfreiheit der Gegenionen.Daraus ergibt sich,daß der Austauscher entweder gut quellfähig oder von vornherein eine sehr offene Struktur aufweisen muß.Häufig wird der Austauscher,wie schon einmal er-wähnt,mit einem Schwamm verglichen(siehe Abb.2).Es sei an die-ser Stelle noch hinzugefügt,daß die Zwischenräume im Maschenwerk der Matrix in Analogie zu den Poren des Schwammes als "Poren" bezeichnet werden,obwohl es sich nur bei wenigen Austauschern wirklich um Poren im eigentlichen Sinne handelt.Trotz dieses allgemeinen Bauprinzips zeigen verschiedene Austauschertypen er-hebliche Unterschiede in ihrem Verhalten,die mit den Einzel-heiten ihrer Struktur zusammenhängen.Die Kunstharz-,minerali-schen-,organischen und Kohlen-Ionenaustauscher sowie die Se-phadexionenaustauscher werden nur in einer Übersicht behandelt, auf die Celluloseionenaustauscher hingegen wird näher eingegan-gen.

2.2.1 Kunstharzionenaustauscher

Die Kunstharzionenaustauscher sind vernetzte,unlösliche,jedoch begrenzt quellfähige Polyelektrolyte mit einem hochpolimeren dreidimensionalen Netzwerk von Kohlenwasserstoffketten als Matrix.Nach ihrem Herstellungsmodus unterscheidet man Polymerisations-und Polykondensationsharze; unter denen die Polykondensationsharze größere Bedeutung besitzen.Als Grundkörper dient bei ersteren meistens Styrol,das mit einem Devinylbenzol vernetzt ist und bei letzteren im wesentlichen Phenöle und Formaldehyde.Als Ankergruppe dienen bei beiden Typen für Kationenaustauscher $-So_3^-$,$-COO^-$,$-PO_3^{2-}$,$-ASO_3^{2-}$,$-Po_3H^-$ und für Anionenaustauscher $-NH_3^+$, NH_2^+, $= N^+$, $- S^+$, $\bigcirc\!\!-N^+(CH_3)_3$. Der Bau der Matrix,die Zahl und Art der Festionen entscheiden über das Verhalten der Austauscher.Je nach der Dissoziationskonstante der Festionen unterscheidet man bei Kationenaustauschern Starke oder Schwachsaure und bei Anionenaustauschern Schwache oder Starkbasiche.Die Art der Festionen entscheidet nicht nur über den Säuregrad sondern hat auch Einfluß auf die Ionenaustauschgeschwindigkeit.Die Kunstharzionenaustauscher haben in der Proteinchemie enorme Bedeutung erlangt und waren für die Aminosäurenanalyse sowie Isolierung und Reindarstellung vieler Enzyme und Hormone unentbehrlich.

2.2.2 Mineralische und synthetische organische Ionenaustauscher

Die wichtigsten in der Natur vorkommenden Austauscher sind Silikate,die in den verschiedensten Formen vorliegen.Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind die Zeolithe(Chabasit,Analcim, Natrolith,Heulandit,Harmotom),-dieses sind alles Kationenaustauscher.Weiter sind bekannt die Glaukonite(Eisen-Alumosilikate mit Kaliumgehalt,ebenfalls Kationenaustauscher)und Apatit bzw.

Hydroxylapatit als Anionenaustauscher.
Das allgemeine Bauprinzip dieser Austauscher entspricht dem= jenigen der Kunstharzaustauscher.Als Gerüst dient z.B. bei Zeolith das Silikatgitter mit einer Überschußladung.Diese Über= schußladung wird von Alkali-oder Erdalkaliionen ergänzt,die als Gegenionen fungieren und gegen andere Ionen ausgetauscht wer= den können.Zirkoniumphosphat,Titaniumphosphat,Zirkoniumarsenat und Amoniummolybdophosphat sind die wichtigsten synthetischen organischen Austauscher,die bei der Untersuchung von Uranium und seiner Spaltprodukte-Rubidium und Caesium-eine große Rolle spielen.Schmelzpermutite und Gelpermutite haben jetzt nur noch historische Bedeutung.In der Proteinchemie haben diese Arten von Austauschern keine Bedeutung erlangt.

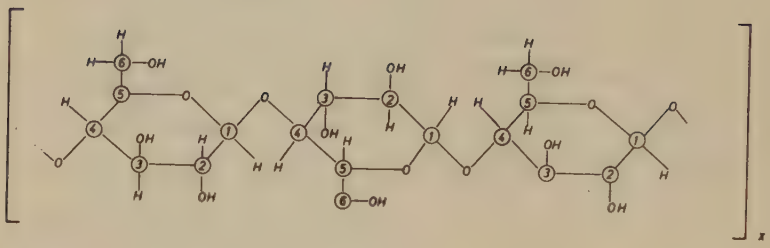
2.2.3 Kohlenionenaustauscher

Durch Behandlung der Braunkohle,Steinkohle Holz,Torf und An= thrazit mit oxydierenden Reagenzien oder konzentrierter Schwe= felsäure bekommen diese Stoffe Ionenaustauschereigenschaften. Das allgemeine Bauprinzip der Ionenaustauscher ist hier auch gültig.Als Festionen fungieren die eingeführten Sulfonsäuren oder Carboxylgruppen.
Gegenüber den zuletztgenannten Gruppen von Ionenaustauschern haben die Austauscher auf Kunstharzbasis viele Vorteile;wie: hohe Kapazität,große mechanische und chemische Widerstandsfä= higkeit,hohe Arbeitsgeschwindigkeit und die Möglichkeit durch Wahl der Festionen und der Vernetzung für ganz bestimmte Zwecke zugeschnittene Austauscher herzustellen(94).Sie haben des= wegen viel größere paraktischere Bedeutung erlangt.

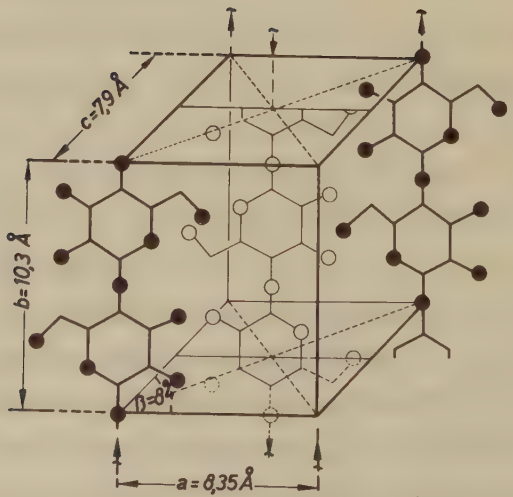
2.2.4 Cellulose-Ionenaustauscher

Nativcellulose-Allgemeines Bauprinzip:

Ein meist in der Natur verbreitetes Polysacharid ist die Cellulose.Sie ist oft mit Hemicellulose und Lignin vergesellschaftet-bzw.verkrustet.Entsprechend ihrer biologischen Funktion als Gerüstsubstanz ist die Cellulose in Wasser und in vielen Lösungsmitteln unlöslich.Man weiß seit mehr als 100 Jahren,daß die Cellulose durch Behandlung mit starker Säure fast quantitativ in Glukose gespalten wird.Jedoch über Art und Ort der Verknüpfung der Glukosereste herrschte Unklarheit bis F r a n c h i m o n t(63) und S k r a u p (207) nachweisen konnten,daß bei der Acetolyse der Cellulose ein Disacharid, Cellobiose,entsteht.Cellobiose ist auch ein Zwischenprodukt bei der Spaltung der Cellulose zur Glukose unter Einwirkung von starken Säuren.Die Aufklärung der Konstitution der Cellobiose gelang H a w o r t h(92).Danach ist Cellobiose ß-Glykosido-Gluko-Pyranose.In ihr ist also ein Glukoserest in ß-glykosidischer Bindung mit dem Kohlenstoffatom 4 des nächsten Ringes verbunden.Die Kettenstrukturformel der Cellulose wird somit als fortlaufende Kette von Glukoseresten in Cellobiosebindungen aufgefasst(Abb.4a).Die eingehenden röntgenographischen Untersuchungen,die auch zum räumlichen Modell geführt haben,unterstützen die Annahme der eben angegeben Formel.Das Bauprinzip ausschließlicher Cellobioseverknüpfungen,kann für den kristallinen Anteil der Cellulose,und das ist der größte Teil der Cellulose,als gesichert gelten.In den natürlichen Fasern,die aus amorphen und kristallinen Bereichen aufgebaut sind,liegen die monoklinen Cellulosekristalliten weitgehend paralell.Die streng



a



b

Abbildung 4

a) Strukturformel der Cellulose.
b) Strukturmodel der Cellulose nach Meyer und Misch.

orientierten kristallinen Bereiche werden auch Micellen genannt. Nativcellulose besteht aus mehreren tausend Cellobioseeinheiten. Da jede Cellobiose 10,4 Å misst- wie man durch Röntgenanalyse der Kristalle gefunden hat-besitzt das Cellulosemolekül die stattliche Länge von 15600 Å oder 1,5 , wäre also mikroskopisch sichtbar, wenn es nicht nur 7 Å dick wäre (110). Hier kann nicht näher auf die Problematik der Kristallstruktur, dem micellaren Bau und der Textur der Cellulose eingegangen werden. Es sei nur eine schematische Darstellung der Elementarzelle der Nativcellulose nach M e y e r und M i c h (140) wiedergegeben.

Nach der micellaren Struktur der Cellulose und Aufbau der feuchten Fasern aus Kristalliten mit wassergefüllten Hohlräumen sind zwei Arten von Reaktionen bei der Cellulose zu erwarten:

1. Micellare Oberflächenreaktion, auch intermicellar genannt, die das Gitter nicht zerstören
2. Intermicellare Reaktionen, die das Gitter ändern.

Zu 1)

Diese Reaktionen werden durch drei Eigenschaften - Hohlraumsystem, die Größe der inneren Oberfläche und die Anziehungskräfte, die an der Oberfläche liegende Gruppen auf herantretende Stoffe ausüben-beeinflußt, die bei den einzelnen Cellulosearten verschieden sind. Die Adsorption von Fremdstoffen, wie Methylenblau, gehört zu dieser Gruppe. Bei der letzteren handelt es sich jedoch um eine Austauschadsorption, die mit der Carboxylgruppe der Cellulose zusammenhängt.

Zu 2)

Hierzu gehören alle Reaktionen, die zur Auflösung der Gitterstruktur der Cellulose führen.

2.2.4.1.1 Cellulose als Ionenaustauscher

Die Feststellung H a r r i s o n s (9o) im Jahre 1912,daß beim Passieren von Natriumchloridlösung durch gereinigte Baumwolle Salzsäure im Eluat erscheint,wurde erst später als Kationenaustauschereigenschaft der Cellulose erkannt und auf ihre Carboxylgruppen zurückgeführt (193,194,195).

A n t - W u o r i n e n und V i s a p ä ä (5) entwickelten eine Methode zur Bestimmung von sehr kleinen Mengen von Carboxylgruppen in der Cellulose. Natürliche wie auch technische Cellulose enthält nämlich eine kleine Zahl von Carboxylgruppen, die von Schmidt(196 / 197) als integrierender Bestandteil des Cellulosemoleküls und von V a n d e r W y k und S t u d e r(219) als zur Hemicellulose gehörig bezeichnet wurden.Durch diesen kleinen Anteil der Carboxylgruppen,die wahrscheinlich durch Oxydation von aliphatischen Alkoholgruppen der Cellulose entstanden sind,ist die Nativcellulose ein schwachsaurer Kationenaustauscher mit geringer Kapazität.Die verschiedenen Eigenschaften,wie Aufnahme von Kationen(z.B.Na^+,Ca^{++}),durch elektrokinetische Versuche festgestellte negative Aufladung und die Kationendurchlässigkeit von Cellulosefilmen,sind auf die Carboxylgruppen zurückzuführen.Meistens sind die Carboxylgruppen in der technischen Cellulose durch metallische Kationen, wie Na,K,Ca abgesättigt.Die "aschefreie Cellulose" ist die durch Behandlung mit verdünnter Säure und Elektrodialyse von diesen Mineralionen befreite Cellulose.Diese aschefreie Cellulose kann bis zur Absättigung seiner Carboxylgruppen Kationen aufnehmen.Die Umsetzung ist als ein Ionenaustausch zu betrachten und zwar von Na^+gegen H^+.

Durch leichte Oxydation mittels oxydierender Substanzen,wie Natriumhypobromid- oder -hypochlorid-Lösung und Stickstoff=tetroxyd kann man die Austauschkapazität der Cellulose bis auf 4 meq/g erhöhen,die auf -COOH zurückzuführen ist. Jedoch sind diese Oxycellulosen in Pulverform in wasser lös=lich und haben deswegen in der Praxis wenig Anwendung gefunden. Die Cellulose selbst ist jedoch von einigen Untersuchern zur Reindarstellung von Enzymen mit Erfolg verwendet worden(18.1o4,222)

2.2.4.2 Substituierte Cellulose-Ionenaustauscher

Durch Einführung von verschiedenen aktiven Gruppen in die Cel=lulose entstehen verschiedene substituierte Cellulosearten, die je nach der eingeführten Gruppe als Anionen-oder Kationen-Austauscher fungieren können.In der Literatur ist eine große Zahl von solchen substituierten Celluloseaustauschern mit verschiedenen Austauscherkapazitäten beschrieben.Einige unter ihnen haben für die Trennung der Serumproteine große Bedeutung erlangt.Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die ver=schiedenen Celluloseaustauschertypen gegeben werden.
Ganz allgemein kann gesagt werden,daß die Ionenaustauscher auf Cellulosebasis wie die Kunstharzaustauscher ionenaustau=schende Eigenschaften besitzen und das allgemeine Bauprinzip - Matrix mit Festionen und Gegenionen,die sich in Poren bewe=gen- auch hier seine Gültigkeit besitzt.Diese beiden Austau=schertypen (Kunstharze und substituierte Cellulose) unter=scheiden sich jedoch in einigen wichtigen Punkten.So liegen z.B. die meisten austauschaktiven Gruppen der Celluloseionen=austauscher,bedingt durch ihre Faserеigenschaft,nahe der Ober=fläche.

Dadurch können Celluloseionenaustauscher größere Moleküle, und das sind die Komponenten der Serumproteine, viel besser austauschen als die Kunstharzaustauscher es vermögen, da bei den letzteren größere Moleküle nicht in die Poren eindringen können. Es ist somit die größere Austauschgeschwindigkeit der Celluloseaustauscher für Makromoleküle gegenüber den Kunstharzaustauschern erklärt, trotz ihrer zahlenmäßig kleineren Austauschkapazität. Die geringere Kapazität für kleinere Elektrolyte bei den Celluloseaustauschern ist für die Trennung von Serumproteinen nur von Vorteil. Der weitere Unterschied besteht darin, daß die Cellulosematrix im Gegensatz zu der Kunstharzmatrix hydrophil ist. Wie aus der Formel der Cellulose hervorgeht (Abb. 4a), besitzt das Cellulose-Molekül an dem 2., 3. und 6. C-Atom Hydroxylgruppen, an denen die austauschaktiven Gruppen sitzen. Über die genaue Lage dieser Gruppen kann nichts ausgesagt werden. Die jüngsten Forschungsergebnisse lassen jedoch verm uten, daß Hydroxylgruppen an dem C-Atom 6 und 2, die reaktionsfähigsten sind. Es ist noch zu erwähnen, daß alle Cellulosemoleküle in diesen Celluloseaustauschern nicht gleich substituiert sind. Neben unveränderten Cellulosemolekülen kommen di- und trisubstituierte Moleküle vor. Der gegenseitige Abstand der aktiven Gruppen beträgt bei Celluloseionenaustauschern etwa 5o Å. Das ist viel weiter im Vergleich zu Ionenaustauschern auf Harzbasis mit etwa 1o Å.

2.2.4.2.1 Verschiedene Typen von substituierten Cellulose-Ionenaustauschern. Oxydierte Cellulose bzw. Oxycellulose

Wie schon erwähnt, enthält die Nativ-, sowie auch die technische Cellulose eine geringe Anzahl von Carboxylgruppen, die

wahrscheinlich durch Oxydation von aliphatischen Alkoholgrup= pen entstanden sind.Diese Carboxylgruppen verleihen der Cellu= lose die ionenaustauschenden Eigenschaften und wurden von S c h m i d t, E.(196 / 197) als integrierender Bestandteil des Cellulosemoleküls angesehen.V a n d e r W y k und S t u = d e r (219,235) dagegen kamen durch ihre Untersuchung (sie konnten bei der Herstellung gereinigter Cellulose unter Aus= schluß von Sauerstoff keine Carboxylgruppen nachweisen) zu dem Schluß,daß diese Carboxylgruppen nicht zum Cellulosemolekül gehören.Diese widersprechenden Ergebnisse können damit erklärt werden,daß die Carboxylgruppen erst sekundär durch Oxydation am C-Atom $_6$ (z.B. bei Reinigungsprozessen oder bei Einwirkung von Strahlen in Anwesenheit von Sauerstoff) entstehen und so= mit zum Cellulosemolekül gehören.Die Cellulose ist also ein schwachsaurer Kationenaustauscher mit geringer Kapazität.Durch leichte Oxydation mittels oxydierenden Substanzen (meist Stickstoffdioxyd) kann ohne Veränderung der Struktur die Anzahl der Carboxylgruppen und somit die Austauscherkapazität der Cellulose gesteigert werden.Es konnte festgestellt werden,daß durch Einwirkung des Stickstoffdioxyd in der Wärme die primä= ren Alkoholgruppen (-CHOH) der an der Oberfläche liegenden Glukoseketten - diese sind infolge der diagonalen Verschrau= bung nur die Hälfte - angegriffen und in COOH übergeführt wer= den (113,138).

Diese anoxydierte Cellulose,auch Oxycellulose genannt,wurde zur Reindarstellung von Hormonen benützt.So konnte A s t w o o d (7) durch eine einfache Methode aus 5o g Cortikotropinpuder 1 g eines Materials gewinnen,das 4o mal stärkere Aktivität besaß als das Ausgangsmaterial.

D a v i d s o n (34) berichtete über Trennung von Farbstof= fen mittels Oxycellulose.Oxydiertes Filterpapier wurde ebenfalls zur Trennung von Histidin,Lysin und Arginin verwendet.(242).

2.2.4.2.2 Phosphorylierte Cellulose

Die phosphorylierte Cellulose konnte durch Behandlung der Baumwolle mit einer Lösung von Phosphorsäure und Harnstoff gewonnen werden(66,234).Dieser Kationenaustauscher wurde zuerst von U r b a i n und S t e m e n im Jahre 1941 (234) zur Enthärtung von Wasser entwickelt und patentiert.Später,1949, beschrieben F o r d und H a l l eine Methode zur Gewinnung der phosphorylierten Cellulose um eine feuerresistente Faser zu entwickeln und patentierten sie ebenfalls.(66).
P e t e r s o n und S o b e r (154) beschrieben folgende Prozedur zur Herstellung von Phosphatcellulose :

> Eine Lösung von 75 g NaOH in 185 ml Wasser wird in 5o g Whatman-Cellulose eingerührt und gut vermischt.Diese brök= kelige Masse läßt man 3o Minuten in einem Eisbad stehen, dann werden 33o ml Wasser langsam dazugegeben.Diese Lösung wird langsam umgerührt;der Boden des Gefässes verbleibt dabei im Eisbad.Nach 15 Minuten beginnt man tropfenweise 8o ml einer Ätherlösung,die 4o ml $PoCl_3$ enthält,dazu zu geben.Während dieses letzten Abschnitts wird die Tempera= tur bei 25 - 3o ^{o}C konstant gehalten.Der pH-Wert beträgt danach ungefähr 6.

C e l l u l o s e p h o s p h a t,ein saurer Kationenaustauscher, ist ein Celluloseester.Nachdem die Phosphorsäure eine dreibasi= sche Säure ist O = P-OH gibt es auch theoretisch 3 Möglichkeiten
OH
zur Esterbildung und zwar Monocellulose-Phosphat,auch Cellulose-

Dihydrogenphosphat genannt (-Cel-O-$P(OH)_2$),dann Dicellulose-Phosphat (-Cel-O-PO(OH)-O-Cel) und Tricellulosephosphat ($-(CelO)_3PO$) (107).

Letzterer kann nicht als ein Ionenaustauscher betrachtet werden,da er nicht ionisiert ist.Bei Cellulose-Dihydrogenphosphat hat die eingeführte Phosphorsäure noch 2 OH-Gruppen und fungiert somit als ein bifunktioneller Kationenaustauscher.Die meiste im Handel befindliche phosphorylierte Cellulose,auch P-Cellulose genannt,ist in dieser Form und hat eine Kapazität von o,7 meq/g.Trotz dieser zahlenmäßig geringen Kapazität hat die phosphorylierte Cellulose -wie alle anderen substituierten Celluloseaustauscher- eine effektiv größere Kapazität für makromolekulare Substanzen als die Austauscher auf Kunstharzbasis (215).Phosphatcellulose-Austauscher eignen sich zur Untersuchung von basischen Proteinen.Außerdem wurden sie zur Trennung von Eisen,Kupfer und Nickel verwendet(82,107).

Bei Dicellulose-Phosphat enthält die substituierte Phosphorsäure nur noch 1 OH-Gruppe und wirkt als ein monofunktioneller Ionenaustauscher.

Da die Quellung mit dem Grad der Vernetzung abnimmt,ist sie bei Dicellulose-Phosphat viel schwächer als bei Monocellulosephosphat.Ersteres ist relativ unstabil und kann leicht durch Hydrolyse in Cellulose-Dihydrogenphosphat übergehen.

Außer dieser drei genannten Typen gibt es wahrscheinlich noch andere Varianten,die mit der Cellulose-Struktur zusammenhängen und zwar je nachdem,wo die substituierten Gruppen sitzen.

Durch Imprägnierung der Nativcellulose mit Polyvinylphosphat, hergestellt aus Harnstoffphosphat und Polyvinylalkohol,entsteht ein Kationenaustauscher von hoher Kapazität.Dieser Aus-

tauscher gehört jedoch nicht zur substituierten Cellulose (33) und wurde zur Trennung von Nucleinsäurederivaten eingesetzt(169-172).

2.2.4.2.3 Sulfoaethyl-Cellulose

Die Sulfoaethylcellulose wurde zuerst von T i m e l l (224) durch Behandlung der Cellulose mit 2-Chloraethylsulfonsäure hergestellt,sie fand jedoch wegen ihrer Wasserlöslichkeit keine Verwendung als Austauscher.Bei diesem Typ von Kationenaustauschern ist der Grad der Substitution maßgebend für seine Wasserlöslichkeit.Deswegen bereitete es Schwierigkeiten einen brauchbaren Austauscher mit einer höheren Kapazität als 1 meq/g zu gewinnen(107).Es gelang G u t h r i e (81,101) durch Behandlung der Cellulose mit 2-Chloraethysulfonsäure in Anwesenheit von Natriumhydroxydlösung einen Austauscher zu entwickeln,der in seiner Salzform nicht mehr wasserlöslich war und eine Kapazität von etwa o,51 meq/g besaß.Diese Sulfoaethylcellulose(Cel-O-CH_2-So_3H),ein saurer Kationenaustauscher, sowie Sulfomethylcellulose(Cel-O-CH_2-SO_3H) wurden mit Erfolg zur Trennung von Proteinen verwendet(162).Erstere ist unter der Bezeichnung SE-Cellulose im Handel erhältlich.
Folgende verwandte Materialien haben ebenfalls ionenaustauschende Eigenschaften : Sulfataethylcellulose,Cl$CH_2CH_2OSO_3H$(83), Sulfobenzyl-Cellulose und 2-Aminoaethylsulfat-Cellulose.Letzterer ist ein basicher Anionenaustauscher.

2.2.4.2.4 Carboxymethyl-Cellulose

Carboxymethyl-Cellulose(Cel-OCH_2COOH) ist ein schwacher Kationenaustauscher,der durch Umsetzung von Alkali-Cellulose mit Mo=

nochlor-essigsäure entsteht.Sie ist ein Cellulose-Methylaether, bei dem 1 H der Methylgruppe durch die Carboxylgruppe substituiert ist.Die lösliche Form der Carboxylmethylcellulose,auch Cellulose-Glykolat genannt,war seit vielen Jahren in ihrer löslichen Form bekannt.Sie ist ein farbloses,kolloidales Cellulosederivat,das bei Wasserzusatz unter Gelbildung aufquillt und bei weiterem Wasserzusatz in Gel-und Sol-Lösung übergeht. Als Ionenaustauscher fand er wegen seiner Wasserlöslichkeit keine Verwendung,wurde jedoch als Waschmittelzusatz,Verdickungsmittel,Emulgiermittel in der Lebensmittel-,Arzneimittel-und kosmetischen Industrie und zur Bohrspülung angewandt.An den Waschfasern wird das Cellulose-Glykolat der Waschmittel irreversibel resorbiert;darauf beruht die vergrauungsverhindernde Wirkung des Cellulose-Glykolats.

Wie schon erwähnt,ist bei den substituierten Ionenaustauschern auf Cellulosebasis die Wasserlöslichkeit abhängig vom Grad der Substitution.Durch Reduzierung der substituierten Gruppen ist es also möglich,eine unlösliche CM-Cellulose herzustellen. Bei einem Substitutionsgrad von mehr als o,7 ist die CM-Cellulose in ihrer H-Form vollkommen wasserlöslich,in ihrer Natrium-Form jedoch schon bei über o,3.Bei einem Substitutionsgrad von o,2 und o,3 ist seine Löslichkeit abhängig vom umgebenden Medium und der Temperatur.Vollkommen unlöslich ist die CM-Cellulose jedoch bei einem Substitutionsgrad von weniger als o,2 (das entspricht einer Kapazität von etwa 1 meq./g Trockengewicht)und bei einem Substitutionsgrad von o,1 ist sie sogar unlöslich in verdünnten Laugen($\frac{107}{157}$).Bei den chromatografischen Arbeiten mit diesem Material sind die Bedingungen,die sogar zu einer temporären Löslichkeit dieses Materials führen

zu vermeiden,da sonst eine gelatinöse Masse entsteht.Das würde bei der Säulenchromatographie einen extremen Strömungswiderstand und damit eine sehr schlechte Durchflußrate bedeuten.
Die meisten handelsüblichen Präparate haben eine Kapazität zwischen o,4 und 1 meq/g Trockengewicht.Bei dieser Kapazität, die einem Substitutionsgrad von weniger als o,2 entspricht,ist die Wasserunlöslichkeit gewährleistet.
Zu erwähnen ist noch die Veränderung des Quellungsgrades bei Überführung der CM-Cellulose von einem Medium in ein anderes, sowie die Veränderung der nutzbaren Kapazität bei verschiedenen pH-Werten.Was die nutzbare Kapazität anbelangt,so ist sie bei pH-Werten zwischen 4-6 am größten.Was die Quellung betrifft,so geht sie bei Behandlung mit verdünnter HCl merklich zurück.
Diese beiden genannten Faktoren spielen eine besonders große Rolle bei Arbeiten mit CM-Cellulosearten von höherem Substitutionsgrad und bestimmen die Auswahl der in Frage kommenden Lösungen.Die Stabilität der CM-Cellulose ist gut,da die Bindungen der aktiven Gruppen mit der Cellulose wie schon erwähnt- Aetherbindungen sind und diese Bindungen gegenüber Hydrolyse sehr widerstandsfähig sind.
Carboxylmethyl-bzw.CM-Cellulose wurde mit Erfolg zur Trennung der Serumproteine,zur Reindarstellung und Trennung von Hormonen und Enzymen,sowie zur Trennung der mittels Papainverdauung gewonnenen γ-Globulinfragmente (46,168,215)verwendet.
Abschließend sei noch das Herstellungsverfahren der CM-Cellulose nach S o b e r und P e t e r s o n (154) kurz angeführt :

> Eine Lösung von 9o g NaOH in 2oo ml Wasser wird in 6o g Whatman-Cellulosepulver eingerührt(Material,das gröber als 335 mesh ist,wird durch Sieben entfernt).Es entsteht eine steife bröckelige Masse.Dann läßt man das Gefäß 3o

Minuten in einem Eisbad stehen unter gelegentlichem Umrühren.Eine Lösung von 3o g Essigsäurechlorid in 4o ml Wasser wird in 3-4 Portionen dazu gegeben und dabei gut vermischt.Bei gelegentlichem Umrühren wird diese weiche,teigige Masse dann in einem Ölbad von 7o °2o Minuten lang erhitzt.Nimmt man sie dann heraus,wird das hellgelbe Produkt in einem Eisbad gekühlt und 5oo ml einer 1o%igen Essigsäure (oder eine entsprechende Menge verdünnter HCl) werden nach und nach dazu gegeben.Die Suspension,die noch stark alkalisch ist,wird dann auf 2 Liter mit Wasser verdünnt und man läßt das Ganze sedimentieren.Nachdem man die trübe,gelbe,überstehende Flüßigkeit entfernt hat,wäscht man das Sediment wiederholt in ähnlicher Weise,um Partikel zu entfernen,die nicht sedimentieren und um Farbe und Alkalien zu entfernen.Zu der verdünnten Suspension setzt man dann 1o ml Eisessig hinzu um es gerade bis zum Kongorotumschlag anzusäuern und nach Absedimentieren und Wiederverwerfung der überstehenden Flüssigkeit gießt man das Sediment in ein 5 inch langes Glasrohr und wäscht es mit Wasser bis das Filtrat nicht mehr sauer ist.So trokken wie möglich kommt die dicke Masse auf das Filter, wird dann mit Aethanol gewaschen.Im Vakuum läßt man den Alkohol evaporieren und dadurch das Produkt trocknen. Ungefähr 45 g weißes Pulver enthalten o,7 meq Säuregruppen pro Gramm.

2.2.4.2.5 Diaethylaminoaethyl-Cellulose

Diaethylaminoaethyl-Cellulose (-O C_2H_4 - $N(C_2H_5)_2$) wurde zuerst von Hartmann(91,166,1o7) entwickelt und wurde zur besseren Anfärbbarkeit der Textilfasern in die Textilindustrie eingeführt.Im Gegensatz zur Cellulose selbst ist diese chemisch modifizierte Cellulose ein stark basischer Anionenaustauscher. Erst durch P e t e r s o n und S o b e r (154 / 21o,215) wurde sie als Anio nenaustauscher zur chromatographischen Trennung biologischer Substanzen mit Erfolg angewandt.Sie ist eine der meist gebrauchten substituierten Austauscher in der Proteinchemie und eignet sich sehr gut zur Trennung der neutralen und sauren Proteine,sowie zur Reinigung vieler Enzyme,Hormone und Peptide(24,25,29,31,32,35,36,38,4o,45,48,49,51,6o,61,62,93,98, 112,128,134,139,15o,154,158,164,165,167,176,2o1,2o2,21o,217,227, 24o,243).

Diaethylaminoaethyl-Cellulose,auch DEAE genannt,kann als ein substituiertes Produkt von Aminoaethyl-Cellulose betrachtet werden,wie aus der Formel zu ersehen ist.Da sie ein tertiäres Amin darstellt,ist sie viel stärker basisch als die Aminoaethyl-Cellulose,der sie in vieler ihrer Eigenschaften ähnelt. Ihre höchste nutzbare Kapazität liegt bei pH 6-9.Die Kapazität der meist verwandten DEAE-Cellulose liegt zwischen o,6 - 1,o meq/g.Es konnte DEAE-Cellulose mit Partikelgröße feiner als 325 mesh erzeugt werden.Da jedoch einerseits die Partikelgröße in bestimmtem Bereich keinen sehr großen Einfluß auf die chromatographische Trennung ausübt und andererseits Säulen,die mit sehr feinkörnigen substituierten Cellulose-Austauschern gepackt sind,eine schlechte Durchflußrate aufweisen,sind bei säulenchromatographischen Untersuchungen die groberen Cellulosen zu verwenden.

Es konnten bis zu 17o mg Protein/g DEAE-Cellulose säulenchro=
matographisch gut getrennt werden.Diese Celluloseart ist von
verschiedenen Herstellungsfirmen unter der allgemeinen Bezeich=
nung DEAE-Cellulose zu erhalten.Wir geben hier vollständigkeits=
halber das Herstellungsverfahren nach P e t e r s o n und
S o b e r (154) an :

> 6o g Cellulose-Pulver wird mit 4o g NaOH in 17o ml destilliertem Wasser vermischt und 3o Minuten im Eisbad gekühlt.Danach wird die Lösung von 35 g re= kristallisiertem 2-Chloräthyl-diäthylaminhydrochlorid in 45 ml Wasser eingerührt und 35 Minuten lang im Wasserbad auf 85 °C erhitzt,sodann im Eisbad abge= kühlt.Zu dieser gelbbraunen Masse wird 25o ml 2M NaCl- zugegeben.Die gut durchgerührte Suspension wird über einer grobkörnigen Glasfritte abgesaugt.Der Rückstand wurde mit 1 N NaOH bis zur Beseitigung der Braunfär= bung gewaschen,abgesaugt und in einer ausreichenden Menge 1 N HCl suspendiert.Die Suspension wurde rasch filtriert und am Büchner-Trichter nacheinander mit 1 N NaOH,1 N HCl und sodann mit 1 N NaOH (etwa je 25o ml) gewaschen.Der Rückstand wurde gut abgesaugt,erneut mit 25o ml 1 N NaOH gewaschen und in ein mit 3 L Was= ser gefülltem Becherglas überführt und verrührt.Die Suspension wird nach Sedimentieren und Abgießen der überstehenden Flüssigkeit 5 mal dekantiert und über einem Büchner-Trichter abgesaugt.Der Rückstand wird mit 5oo ml Äthanol gewaschen und sodann im Vakuum- Exikator getrocknet.

2.2.4.2.6 Aminoaethyl-Cellulose

Die Aminoaethylcellulose,auch AE-Cellulose genannt(Cel-O-CH_2-CH_2-NH_2-),ist ein schwach basischer Anionenaustauscher.Seine Basizität ist etwas schwächer als bei DEAE-Cellulose.

.Er ist bei niedrigem pH vollkommen ionisierbar.Der Schwellungsgrad der AE-Cellulose ist sehr groß. Dies muß bei der Säulenchromatographie in Betracht gezogen werden und zwar besonders dann,wenn mit Gradienten gearbeitet wird,die in ihrem pH und in der Ionenstärke stark veränderlich sind(1o1,1o6,2o3).

2.2.4.2.7 ECTEOLA- Cellulose

Die ECTEOLA-Cellulose ist ein Reaktionsprodukt aus Epichlor= hydrin,Triäthanolamin und Natrium-Cellulose(11,214) und be= sitzt eine sehr komplexe Natur.Durch ihren Gehalt an tertiären Aminogruppen ist sie ein schwach basischer Anionenaustauscher. Er ist im Ganzen schwächer basisch als DEAE-Cellulose.Die Austauscherkapazität der handelsüblichen ECTEOLA-Cellulose liegt zwischen o,3-o,4 meq/g.Seine höchste Kapazität besitzt er - wie auch alle anderen Austauscher auf Cellulosebasis- bei niedrigen Salzkonzentrationen.Seine Titrationskurve erstreckt sicn zwischen pH 4-9.

ECTOLA-Cellulose hat jedoch für die Proteine eine geringere Kapazität als die DEAE-Cellulose.Mit Erfolg wurde die ECTOLA-Cellulose besonders zur Chromatographie von Nucleinsäuren,Necleo= proteinen sowie pflanzlichen Viren und Bakteriophagen angewandt (1o,17,23,27).

2.2.4.2.8 TEAE-Cellulose

Diese Cellulose wird durch Behandlung der DEAE-Cellulose mit Athylbromid hergestellt.Sie wurde von Porath in die Chromatographie eingeführt(162) und ist ebenfalls ein basischer Anionenaustauscher.Interessant erscheint,daß es M o r g a n und H u l t i n (147) gelang die wasserlöslichen Fraktionen von Leberhomogenaten an TEAE-Cellulose zu fraktionieren.Der"Peak"-6 des Chromatogramms,das sie damit erhielten,ist mit dem sogenannten pH-5-Faktor(236),welcher am meisten RNA(Ribunucleinsäure) enthält,identisch.

2.2.4.2.9 Guanidoaethyl-Cellulose

Guanidoaethyl-Cellulose (Cel-OC_2H_5.NHC $=NH_2NH^+Cl^-$),auch GE-Cellulose genannt,ist ein stark basischer Austauscher und wurde zur Chromatographie von Globulinen verwandt(2o3).

2.2.4.2.1o Paraaminobenzyl-Cellulose

Paraaminobenzyl-Cellulose(Cel-O.CH_2 $\cdot C_6H_4NH_2$),auch PAB-Cellulose genannt,ist ein schwach basischer Anionenaustauscher.Die Aminogruppen sind dissoziierbar und können mit Proteinen,Antigenen, Enzymen gekoppelt werden.PAB-Cellulose bildet somit für diegenanten Stoffe ein spezifisches Adsorbent(2o,127,2o4).

2.2.4.2.11 Hydroxylapalit-Cellulose

Diese Cellulose bildet ein äusserst brauchbares Adsorptionsmittel für Proteine und Nucleotide(225).

2.2.4.2.12 Poliaethylenimin-imprägnierte Cellulose

Poliaethylenimin-imprägnierte Cellulose,PEI-Cellulose genannt, wird durch Imprägnierung von Nativcellulose mit Poliäthylenimin gewonnen und ist ein relativ stark basischer Anionenaustauscher. Das Poliäthylenimin (- $NH-CH_2 \cdot CH_2$ -) ist praktisch irreversibel an Cellulose gebunden.Dieser Austauscher gehört nicht zu den substituierten Celluloseionenaustauschern.Polianionen,wie sie bei Oligonucleotiden vorliegen,können relativ selektiv adsorbiert und dessorbiert werden.
Ebenfalls nicht zur substituierten Cellulose gehörend ist die phosphatimprägnierte Cellulose,die durch Anlagerung von Polimeta= phosphat an PEI-Cellulose hergestellt wird.Diese Poli-P-Cellulose ist ein mittelstarker Kationenaustauscher und eignet sich beson= ders zur Trennung von Nucleinsäurederivaten(169-172).

2.2.5 Ionenaustauscher auf Cephadex - Basis

Durch Einführung von Ionengruppen in die quervernetzten Dextran-Ketten des Sephadex erhält man eine neue Art von Ionenaustauscher. Die funktionellen Gruppen sind durch Verätherung an die Glucose= reste in den Polisacharidketten gebunden.Je nach ihrem Vernetzungs= grad unterscheidet man verschiedene Austauscher diesen Typs und zwar :

1. DEAE-Sephadex C 5o und C 25,Anionenaustauscher mit einer tota= len Austauschkapazität von 3-4 meq/g.Diese eignen sich besonders gut,auch nach eigener Erfahrung,zur Trennung der Serumproteine, sowie zur Trennung der Nucleotide;

2. SE-Sephadex C 5o und C 25,ein stark saurer Kationenaustauscher mit einer Kapazität von etwa 2 meq/g ;

3. CM-Sephadex C 5o und C 25,ein Kationenaustauscher von hoher Austauschkapazität von 4-5 meq/g.Dieser Austauscher ist am wirksamsten bei pH-Werten über 4-5.

Die beiden letztgenannten Kationenaustauscher eignen sich ebenfalls gut zur Trennung der Proteine sowie verwandter Stoffe.

2.2.6 Eigenschaften

2.2.6.1 Korngröße

Als Maß der Korngröße wird der Durchmesser in mm angegeben. Die Korngröße der Austauscher - gleich welchen Typs - hat einen großen Einfluß auf den Ionenaustauschvorgang.So ist z.B. die Austauschgeschwindigkeit umgekehrt proportional dem Kornradius.Die Austauschgeschwindigkeit kann somit durch Verringerung der Korngröße erhöht werden.Umgekehrt wie die Austauschgeschwindigkeit verhält sich die Durchflußgeschwindigkeit,d.h., je kleiner die Korngröße umso geringer ist die Durchflußgeschwindigkeit,da der Reibungswiderstand bei abnehmender Korngröße zunimmt.Weiterhin ist zu beachten,daß die kleinen Körner mechanisch stabiler sind als die großen.Wichtig ist nicht nur die absolute Korngröße,sondern auch ihre Einheitlichkeit.Bei zu unterschiedlicher Korngröße einer Packung z.B.ist der Strömungswiderstand auch ungleichmäßig,und eine scharfe Trennung ist damit nicht mehr zu erzielen.Außerdem neigt die Packung zu Randgängigkeit und Kanalbildung.Um einheitliche Körner bei einem fabrikmäßig hergestellten Austauscher zu bekommen,müssen die Austauscher vorbehandelt werden.Man geht bei den Ionenaustauschermaterialien so vor,daß man die Pulver erst in einer Lösung,meist Wasser oder die zu Anfang der Elution zu verwendenden Puffer,suspendiert(2%ig) und etwa 2-3 Minuten stehen läßt.Dadurch setzen sich die großen Partikelchen ab,da die Abstzungsgeschwindigkeit dem effektiven Durchmesser der Körner proportional ist.Das Sediment wird verworfen und der Überstand wird in einem Zylinder abgegossen und 45 Minuten stehen gelassen.In diesem Zeitraum setzen sich die

Körner,die etwa gleiche Größe haben,ab,und die zu kleinen Kör=
ner bleiben noch in der Lösung suspendiert.Der trübe Überstand,
der die suspendierten kleinen Teilchen enthält,wird verworfen
und der sedimentierte Teil wird zum Gießen der Säule verwendet.
Durch dieses Verfahren werden alle zu kleinen und übergroßen Teil=
chen entfernt.
Es ist noch zu erwähnen,daß in der angelsächsischen Literatur
die Korngrößen nach genormten Siebgrößen in "mesh"-bzw.BSS Mesh-
Zahlen angegeben wird.Zur Umrechnung gilt für US mesh die For=
mel $\frac{16}{\text{mesh}}$ =Kornradius in mm und für die britischen Siebnormen
die Formel 1 BSS Mesh = $\frac{\text{Faktor 12,2 bis 15,o}}{\text{Partikeldurchmesser in mm}}$.
Im allgemeinen haben die Cellulose-Ionenaustauscher eine Parti=
kelgröße von 15 -2o .Zu beachten ist,daß die Partikelgröße
im nassen und trockenen Zustand verschieden ist.Dies beruht
auf dem Quellungsvermögen des Austauschers,das wiederum von An=
kergruppen und dem Vernetzungsgrad abhängt.

2.2.6.2 Kapazität

Eine der wichtigsten Eigenschaften der Ionenaustauscher ist die
Kapazität,d.h. der Grad ihrer Fähigkeit Gegenionen aufzunehmen.
Die Kapazität eines Austauschers ist unter idealen Bedingungen
eine Materialkonstante,die von der Zahl der Festionen bestimmt
wird,da diese quantitativ von den Gegenionen zur Erhaltung der
Elektronenneutralität kompensiert werden müssen.Bei der Angabe
der Kapazität sind jedoch die jeweiligen Versuchsbedingungen
unbedingt mit anzugeben.Man unterscheidet zwischen der Gesamt=
kapazität,bei der die Gesamtmenge der austauschfähigen Gegen=

ionen und der nutzbaren Kapazität,bei der die bei den gegebenen Versuchsbedingungen zum Austausch kommenden Gegenionen maß= geblich sind.Die Durchbruchskapazität ist das Aufnahmevermögen einer Packung für ein bestimmtes Ion bis zum Durchbruch aus der Säule.Sie ist stets geringer als die Gesamtkapazität der Packung. Dazu siehe auch Seite 17 und die Abbildung 3 .Je nach der ge= wählten Maßeinheit - eine Volumenkapazität und eine Gewichts= kapazität und zwar im trockenen und feuchten Zustand des Austau= schers.Die Kapazität wird meistens in Milliäquivalent pro Gramm (mval/g) oder in Milliäquivalent je loo Gramm(mval/loo g) des Austauschers angegeben.Dabei werden die Kationenaustauscher in der H^+-Form und die Anionenaustauscher in die Cl^-Form bzw. in OH^- -Form verstanden.

pH-Titration bei den Cellulose-Ionenaustauschern :

Zur Bestimmun der Kapazität haben sich besonders für Cellulose-Ionenaustauscher die pH-Titrationen bewährt.Diese basiert auf der pH-Abhängigkeit der Kapazität und gestattet eine genaue Charakteresierung der Austauscher nach ihren Wirkungsgruppen. Die Methode der pH-Titration wurde zuerst von G r i e s s b a c h (79) für Ionenaustauschharze angegeben.Bei der pH-Titration der Cellulose-Ionenaustauscher geht man wie folgt vor : eine Probe von dem zu untersuchenden Cellulose-Ionenaustauscher wird über Nacht bei 5o Grad Celsius getrocknet und 2 g eingewogen. Zur Überführung der Kationenaustauscher in die H-Form und der Anionenaustauscher in die OH-Form wird die eingewogene Menge mit 5o ml o,5 n Salzsäure bzw.5o ml o,5n Natronlauge übergossen

und auf einer Nutsche neutral gewaschen.Anschliessend wird das Pulver mit wenig Wasser in das Titrationsgefäß überführt und 25 ml 1 M Natriumchloridlösung zugegeben.Nach erfolgtem Austausch reagieren die Kationenaustauscher sauer und die Anionenaustauscher basisch.Danach erfolgt die Titration mit o,1 n Natronlauge bis pH lo bzw.mit o,1 n Salzsäure bis pH 3.Die Titration erfolgt unter ständigem Rühren und die pH-Änderung wird kontinuierlich verfolgt.In einem Koordinatensystem wird das Volumen der Titrationsflüssigkeit als Abszisse und die pH-Werte als Ordinate aufgezeichnet.Aus der gewonnenen Kurve kann die Kapazität der Austauscher abgelesen werden - wofür der Schnittpunkt der Kurve mit der Geraden pH 7 entscheidend ist.Die so gewonnene Kapazität liegt bei verschiedenen Cellulose-Ionenaustauschern zwischen o,4 bis 1 meq/g Trockengewicht.
Über den Vergleich der Kapazität der Cellulose-Ionenaustauscher und Austauscher auf Kunstharzbasis siehe Seite 4-5 .

2.2.6.3 Selektivität

Eine der Grundeigenschaften der Ionenaustauscher ist ihr selektives Verhalten gegenüber bestimmten Stoffen,d.h. gewisse Gegenionensorten werden gegenüber anderen bevorzugt aufgenommen. Diese Erscheinung kann man mit dem erwähnten Schwammmodell nicht erklären,sie bildet jedoch die Grundlage der chromatographischen Trennung verschiedener Stoffe.So z.B. passiert das Gammaglobulin eine Säule,die mit DEAE-Cellulose beschickt ist,ohne Verzögerung und erscheint nach Ablauf des Zwischenkornvolumens (hold up) im Eluat.Dagegen haftet das Coeruloplasmin sehr fest an dem Austauscher und ist erst durch Veränderung der Salzkonzentration

oder/und pH des Eluens eluierbar.
Der Ionenaustausch strebt stets einem Gleichgewicht zu,bei dem der Quozient der Konzentrationsverhältnisse der beiden auszutauschenden Ionen im Austauscher und der Lösung zu einer Konstante wird,die von der Konzentration unabhängig ist.Dieser Zustand wird durch den Selektivitätskoeffizienten gekennzeichnet.Dieser ist keine Materialkonstante im engeren Sinne und ist von verschiedenen Faktoren abhängig :

Größe und Ladung der auszutauschenden Ionen
Korngröße,Vernetzungsgrad und Kapazität
Art der Ankergruppen
Bau der Matrix
Konzentration und Temperatur der Lösung

Im allgemeinen kann gesagt werden,daß der Austauscher Gegenionen mit hoher Wertigkeit besonders aus verdünnten Lösungen,kleinere Ionen,die eine geringe Dehnung der Matrix verursachen und Gegenionen,die mit den Festionen oder der Matrix stärkere Bindungen einzugehen vermögen,bevorzugt aufnimmt.Die größeren Moleküle werden nur dann gegenüber den kleineren Molekülen bevorzugt,wenn der Einfluß der Polarisierbarkeit überwiegt,da in solvatisiertem Zustand größere Ionen stärker polarisierbar sind und der Austauscher für diese größere Affinität besitzt.Abweichungen von diesen allgemeinen Grundsätzen sind möglich,da mehrere der genannten Faktoren sich gegenseitig beeinflussen.Eine quantitative Behandlung dieser Faktoren sprent den Rahmen dieser Arbeit.

2.2.6.4 Quellung

Unter Quellung versteht man ganz allgemein die Volumenveränderung eines Austauschers beim Übergang von einem Medium in ein anderes. Die bei der Überführung eines trockenen Austauschers in eine Lösung auftretende Volumenzunahme wird als absolute Quellung bezeichnet in Gegenüberstellung der Atmungsdifferenz, die eine Volumenveränderung eines Austauschers beim Wechsel seines Mediums darstellt. Da sich bei der Quellung das Maschenwerk der Matrix dehnt, erhöht sich die Austauschgeschwindigkeit, da die Gegenionen im weiten Maschenwerk größere Beweglichkeit besitzen.
Umgekehrt ist ein Ionenaustausch bei zu starker Abnahme des Quellvermögens des Austauschers stark herabgesetzt. Die Kenntnis der Faktoren, die die Quellung beeinflussen können, ist nicht nur von theoretischem Interesse sondern besitzt auch eine große praktische Bedeutung. Einerseits kann bei zu starker Quellung der Quellungsdruck so zunehmen, daß eine Sprengung der Säule verursacht wird, andererseits erhöht sich bei zu starker Entquellung die Gefahr der Kanalbildung und Randgängigkeit in der Packung, die wiederum das Gelingen der chromatographischen Trennung in Frage stellen kann. Dank der guten Quellfähigkeit der Cellulose-Ionenaustauscher ist die Gefahr des Trockenlaufens gepackter Säulen sehr gering.
Die trockene Cellulose kann etwa 22-3o % Wasser aufnehmen. Ein kleiner Teil wird an die Hydroxylgruppen der Cellulose adsorbiert (123), das restliche aufgenommene Wasser wird kapillar gebunden. Die Hohlräume, gebildet durch räumliche Anordnung der Micellen, öffnen sich und gestatten somit eine größere Bewegungsfreiheit der Gegenionen.

Folgende Faktoren spielen bei der Quellung eine Rolle :

1. Vernetzungsgrad : Je geringer die Vernetzung umso stärker die Quellung.
2. Kapazität : Die Quellung ist bei Austauschern von höherer Kapazität stärker.
3. Wertigkeit der Gegenionen :Wenn ein einwertiges Ion durch ein zweiwertiges ersetzt wird,geht die Quellung infolge der Abnahme der osmotischen Druckdifferenz in Porenflüssigkeit und äusserer Lösung auf die Hälfte zurück.
4. Wechselwirkung zwischen Gegenionen und Festionen : Die Ionen, die mit Festionen Assoziate bilden,setzen die Quellung herab.
5. Größe der Gegenionen :Größere Gegenionen verursachen eine stärkere Quellung.
6. Konzentration der Lösung : Bei zunehmender Konzentration steigt der Quellungsdruck.

2.2.6.5 Vernetzung

Durch den Vernetzungsgrad der Ionenaustauscher,besonders die auf Kunstharzbasis,werden verschiedene Eigenschaften der Austauscher beeinflußt:so ihre Löslichkeit,Quellung,Selektivität und Aus= tauschgeschwindigkeit.Eine zu enge Vernetzung bzw. ein zu großer Vernetzungsgrad vermindert die Austauschgeschwindigkeit und die Quellung und setzt die obere Grenze für die Moleküle,die in den Austauscher eindringen sollen,herab(Siebeffekt).

2.2.6.6 Stabilität und Verschleiß

Physikalisch chemisch und mechanische Beständigkeit der Austausch rmaterialien sind für ihren Gebrauch im Laboratorium und in der Technik von sehr großer Bedeutung. Die heute von verschiedenen Firmen hergestellten Ionenaustauscherharze sind bei Einhaltung der angegebenen Arbeitsbedingungen genügend stabil.
Entsprechend ihrer biologischen Funktion als Gerüstsubstanz ist die Cellulose gegenüber vieler Agentien erstaunlich stabil und ist sogar bei Siedetemperaturen gegenüber verdünnten Säuren und Alkalien praktisch beständig. Erst bei der Behandlung mit konzentrierten Säuren und anschließendem Kochen mit verdünnten Säuren wird sie vollständig abgebaut. Ausserdem ist sie empfindlich gegenüber starken Oxydationsmitteln. Die Cellulose zeigt eine auffallende Resistenz gegenüber vieler Fermente und Fäulnisprozesse. Nur einige Bakterien, Pilze und andere Mikroorganismen, die das Ferment Cellulase bilden, sind zum biochemischen Celluloseabbau befähigt. Die Cellulose wird mittels Cellulase bis zu Glukoseresten (über Cellobiose) abgebaut. Die substituierten Cellulose-Ionenaustauscher können ebenfalls von der Cellulose abgebaut werden.
Auf Grund der guten Beständigkeit und Regenerierbarkeit können Cellulose-Ionenaustauscher über längere Zeit aufbewahrt und immer wieder mit gutem Erfolg verwendet werden. Dazu siehe auch den Abschnitt : Waschen und Regenerieren.
Diese Materialien bleiben bei einer pH-Änderung von 4-8 unverändert. Ein längerer Kontakt mit Lösungen, die saurer sind als pH 4 soll vermieden werden, , obwohl eine kurze Behandlung mit 1 n HCL keine Veränderung hervorruft (154). Auch die mechanische

Stabilität der Cellulose,die in ihrer Struktur begründet ist, ist erstaunlich gut.Man kann um die erwünschte Durchflußrate bei einer Säule,die mittels fortlaufend ansteigendem Druck (o,7 kg/cm^3) gepackt ist,zu bekommen,auch mit Überdruck ar= beiten,ohne eine mechanische Schädigung befürchten zu müssen.

3 M e t h o d i k

3.1 Methodik der Gradientenelution

3.1.1 Grundlagen

Für die chromatographische Trennung der Eiweißkörper ist die Erkenntnis wichtig,daß einerseits das Proteinmolekül ein unstabiles Molekül darstellt und bei der Einwirkung von verschiedenen Agentien leicht zerstört bzw. denaturiert wird.Andererseits ist der Bereich der Bedingungen unter denen sie ihre Adsorptiven und dessorptiven Eigenschaften ändern klein.
Die Gradientenelutionschromatographie,besonders in der von S o b e r und P e t e r s o n angegebenen Form (154) , eignet sich somit am besten für die Trennung der Serumproteine,da einerseits keine stärkeren Lösungsmittel verwendet werden,andererseits der Bereich der Veränderung nicht sehr groß ist.
Das Proteinmolekül besitzt nach seiner Trennung voll seine immunologische und elektrophoretische Eigenschaft und weicht nicht in seiner Sedimentationskonstante und in seinem Gehalt an Kohlehydrat von dem des Ausgangsmaterials ab.
Zur Durchführung der Methodik wird die zu untersuchende Lösung - z.B. das Serum - auf die Säule gegeben.Nachdem die Lösung in die Packung eingesickert ist,wird mit dem am Anfang der Elution verwendeten Puffer nachgewaschen.Anschließend wird die Säule mit dem Apparat zur Herstellung des Gradienten verbunden und mit der Elution begonnen.Das Prinzip der Methode besteht darin,daß man mit einem Eluens arbeitet,dessen Ionen gegenüber den zu untersuchenden Ionen eine geringere Affinität zu dem Adsorb ns

bzw.Ionenaustauschmaterial besitzen.Die Ionen des Eluens über=holen somit die an der Säulenfüllung adsorbierten Ionen des Gemisches.Durch ständiges Nachfließen neuen Eluens werden trotz=dem die adsorbierten Ionen des Gemisches von den Ionen des Elu=ens ersetzt und zwar nach dem Grad ihrer Selektivität.Somit bilden sich,wie im vorigen Kapitel schon erwähnt, "Fronten"aus. Durch ständige Änderung der Konzentration und /oder pH des Elu=ensmittels wird auch die eluierende Kraft ständig gesteigert. Somit laufen die adsorptiven und dessorptiven Vorgänge (bzw. der Ionenaustausch) in der Säule viel schneller als bei der einfa=chen Elutionschromatographie ab,bei der die Zusammensetzung des Eluens nicht verändert wird.Die Fronten bleiben somit auch schärfer als bei der einfachen Elutionschromatographie.Zusammen=fassend kann man sagen,daß durch eine ständige Änderung der Elutionsmittel in ihrer Zusammenstzung eine Verminderung des er=forderlichen Lösungsmittelvolumens bzw.Puffers,eine Verschärfung der Fronten bzw. der chromatographischen "Peaks" ,eine Verminde=rung der unnötig großen Abstände zwischen den einzelnen Peaks, eine Verminderung der Schwanzbildung und im ganzen eine bessere Trennung in kürzerer Arbeitszeit erreicht wird.

Je nachdem,ob die Änderung der Zusammensetzung des Eluens kon=tinuierlich oder stufenweise geschieht,unterscheidet man zwischen einer kontinuierlichen Gradienten-Elutionschromatographie und einer stufenweisen Elutionschromatographie.Bei letzterer werden die beiden Puffer nicht miteinander gemischt sondern es folgt nach Ablauf des ersten Puffers der zweite mit einer anderen Kon=zentration und dann der dritte usw.Bei der kontinuierlichen Gra=dientenelutionschromatographie unterschiedet man,wie schon frü=her erwähnt,je nach Verlauf des Gradienten einen linearen,konkaven,

konvexen und einen wellenförmigen Gradienten,der sowohl anstei= gend als auch absteigend sein kann.
Man unterscheidet weiterhin zwischen einem Konzentrations= und einem pH-Gradienten.Es kann jedoch auch ein Eluens verwendet wer= den,das sowohl seine Konzentration als auch sein pH ändert.

3.1.2 Kontinuierliche Gradienten

3.1.2.1 Apparaturen

Für die Leistungsfähigkeit einer Apparatur zur Erzeugung eines kontinuierlichen Gradienten sind folgende drei Kriterien maß= gebend :

1. Die Reproduzierbarkeit des erzeugten Gradienten.
2. Die Möglichkeit eine große Anzahl von Gradienten herzustellen und
3. Die Einfachheit der Bedienung.

Nachfolgend werden einige dieser Apparaturen beschrieben und ihre Vor= und Nachteile erwähnt.

In der Literatur sind verschiedene Apparaturen zur Erzeugung des Gradienten angegeben.Einige davon kann man selbst herstellen bzw.herstellen lassen und einige sind im Handel erhältlich.Im Prin= zip arbeiten alle nach dem gleichen Grundschema : ein Gefäß, daß verschieden gestaltet sein kann,enthält einen Puffer von konstanter Zusammensetzung.Dieses wird mit einem zweiten Gefäß (Mischgefaß) durch eine bestimmte Anordnung verbunden. Eine gu= te Durchmischung beider Puffer darin wird durch einen Magnet= rührer oder eine andere apparative Anordnung gewährleistet.Das Mischgefäß ist mit der Trennsäule verbunden und enthält in zu

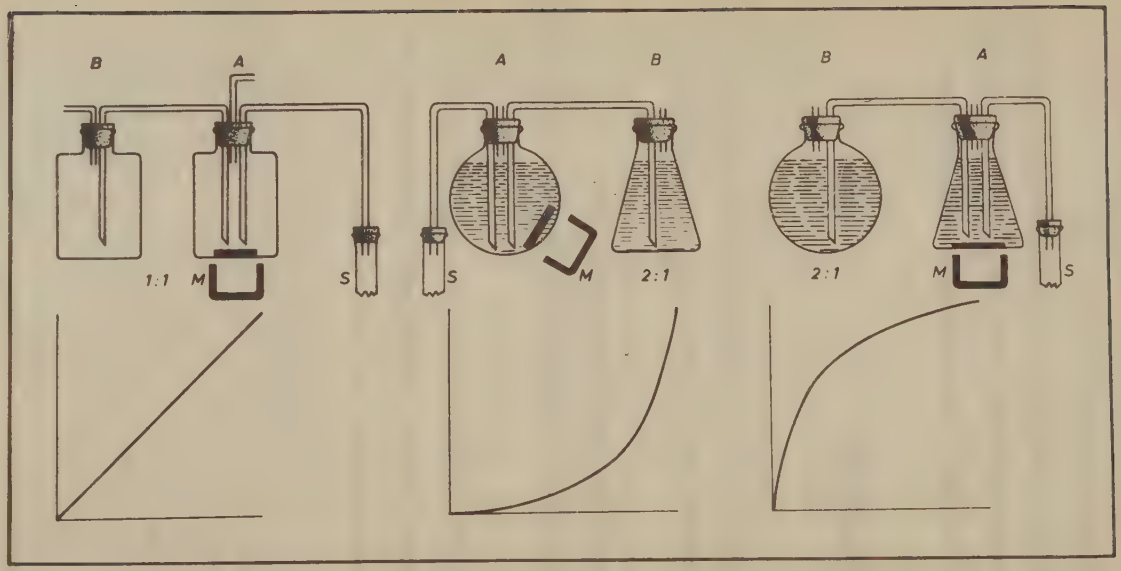


Abbildung 5

Einfache Apparaturen zur Erzeugung kontinuierlicher Gradienten für die Säulenchromatographie.
A=Mischgefäß, B=Ergänzungsgefäß, M=Magnetrührer, S=Säule.

Anfang der Elution zu verwendenden Puffer.Das e ste Gefäß(Er=
gänzungsgefäß) enthält den Puffer mit der höchsten Konzentration
bzw.den Grenzpuffer.Konzentration oder/und pH der Lösungen in
beiden Gefäßen stellen die Grenzwerte des Gradienten da.Von dem
Mischgefäß strömt Elutionsmittel in die Säule und vom Ergänzungs=
gefäß in das Mischgefäß.Die Zusammensetzung der beiden Lösungen,
das Form-und Volumenverhältnis beider Gefäße,die das Volumenver=
hältnis der beiden zu mischenden Flüssigkeiten bestimmen,und das
Verhältnis der Durchflußgeschwindigkeit vom Mischgefäß zur Säu=
le und vom Ergänzungsgefäß zum Mischgefäß bestimmen den Verlauf
des Gradienten.Es können auch mehrere hintereinandergeschaltete
Gefäße verwendet werden.Durch richtige Auswahl der Puffer und
der Anordnungen ist es möglich,jede beliebige Gradientenform
zu erzeugen.Ein linearer Gradient wird in der einfachsten Form
durch Verbindung von zwei Gefäßen gleicher Volumina erzeugt.
Beide Gefäße werden auf gleicher Ebene angeordnet,sodaß auf
Grund des Gesetzes der kommunizierenden Röhren beide Flüssig=
keitsspiegel in der Waagerechten liegen.Im Verlauf des Versuches
sinken die beiden Flüssigkeitsspiegel je nach Durchflußgeschwin=
digkeit vom Mischgefäß zur Trennsäule schneller oder langsamer
ab,jedoch bleibt das Verhältnis beider Lösungen konstant (1:1).
Es muß jedoch darauf hingewiesen werden,daß ein streng linearer
Gradient wegen der Dichteunterschiede der beiden Lösungen sel=
ten zu erhalten ist.Zur Vermeidung zu starker Verdunstung sollen
die Gefäße oben,unter Aussparung eines Luftzutrittsrohres,ab=
geschlossen werden.
Die Lösung im Mischgefäß muß ständig durch einen Magnetrührer
gerührt werden.In Abbildung 5 links ist eine solche Anordnung
mit damit erhaltenen Gradienten schematisch dargestellt.

Sind in der oben genannten Anornung die Volumina der beiden Gefäße bei gleichem Stand der Flüssigkeitsspiegel verschieden, so entsteht ein konkaver oder ein konvexer Gradient, je nachdem, ob das Volumen im Mischgefäß größer ist als im Ergänzungsgefäß oder umgekehrt. Über den Grad der Konkavität bzw. Konvexität entscheidet der Volumenunterschied der beiden Gefäße. Je größer z.B. das Volumenverhältnis Mischgefäß: Ergänzungsgefaß bei gleichem Stand der Flüssigkeitsspiegel ist, umso konkaver verläuft der erzeugte Gradient. Eine Anordnung dieser Art, die sehr oft zur säulenchromatographischen Untersuchung von Serumproteinen mit Celluloseionenaustauschern ($\frac{50,51,54,55}{118-120,134}$) verwendet wird, besteht aus einem Rundkolben als Mischgefäß und einem Erlenmeyerkolben. Ersterer enthält den zu Anfang der Elution zu verwendenden Puffer und ist mit dem Erlenmeyerkolben durch einen Siphon verbunden. Der Boden beider Gefäße befindet sich in einer Ebene und das Volumenverhältnis des Mischgefäßes (Rundkolben) zum Ergänzungsgefäß (Erlenmeyer-Kolben) bei gleichem Stand der Flüssigkeitsspiegel beträgt 2:1. Ein seitlich angebrachter Magnetrührer im Rundkolben sorgt für gute Durchmischung der Lösung. Der Rundkolben ist mit der Trennsäule verbunden. In Abbildung 5, Mitte, ist eine solche Anordnung mit dem damit gewonnenen Gradienten schematisch dargestellt. Das Gesamtvolumen an Puffer und somit auch die Größenordnung des Systems wird bei verschiedenen Versuchen den Erfordernissen angepaßt - je nachdem, ob kleinere oder größere Trennsäulen verwendet werden.

Diese Apparatur wurde auch bei den meisten unserer chromatographischen Untersuchungen verwendet.

Der Rundkolben enthielt bei unseren Versuchen einen o,ol M Natriumphosphatpuffer pH 8 und der Erlenmeyerkolben einen primären

Natriumphosphatpuffer o,5 M pH 4,5.Das nötige Gesamtvolumen an Puffer und somit auch die Größenordnung des erwähnten Systems war bei verschiedenen Versuchen,je nachdem,ob kleinere oder größere Trennsäulen verwendet wurden,verschieden.Das Volumenverhältnis des Rundkolbens zum Erlenmeyerkolben bleibt jedoch immer konstant.Es können aber auch Apparaturen verwendet werden,bei denen das Volumen im Mischgefäß immer konstant bleibt. In Abbildung 6a ist eine solche Apparatur schematisch dargestellt. Der Grenzpuffer,also der Puffer mit der größten Konzentration, fließt aus dem Ergänzungsgefäß A mittels einer Druckvorrichtung mit konstanter Fließgeschwindigkeit in das Mischgefäß und von dort nach Durchmischung (mittels einer Rührvorrichtung) in das Chromatographierohr.Die Fließgeschwindigkeit von dem Mischgefäß zur Trennsäule ist gleich groß wie von dem Ergänzungsgefäß zum Mischgefäß und bleibt ebenfalls während der gesamten Versuchsdauer konstant.Die Lösung des Mischgefäßes nimmt exponentiell den Gehalt des Puffers des Ergänzungsgefäßes an.Der gewonnene Gradient ist,wie aus der Abbildung zu ersehen,konvex.

Von D o n a l d s o n und Mitarb.(41),von B a n n i s t e r und Mitarb.(8),sowie von M a d e r(132) angegebene Apparaturen arbeiten ebenfalls mit konstantem Volumen im Mischgefäß während der Entwicklung des Chromatogramms.Die Abbildung 6b zeigt eine schematische Darstellung der von A l m,W i l l i a m s und T i s e l i u s(5) angegebenen Apparaturen zur Erzeugung eines kontinuierlichen Gradienten nach dem oben beschriebenen Prinzip.Wie zu ersehen ist,wird durch ein unterbrochenes magnetisches Feld ein Magnetrührer im Mischgefäß auf- und abwärts bewegt. Dies gewährleistet eine gute Durchmischung der flüssig-

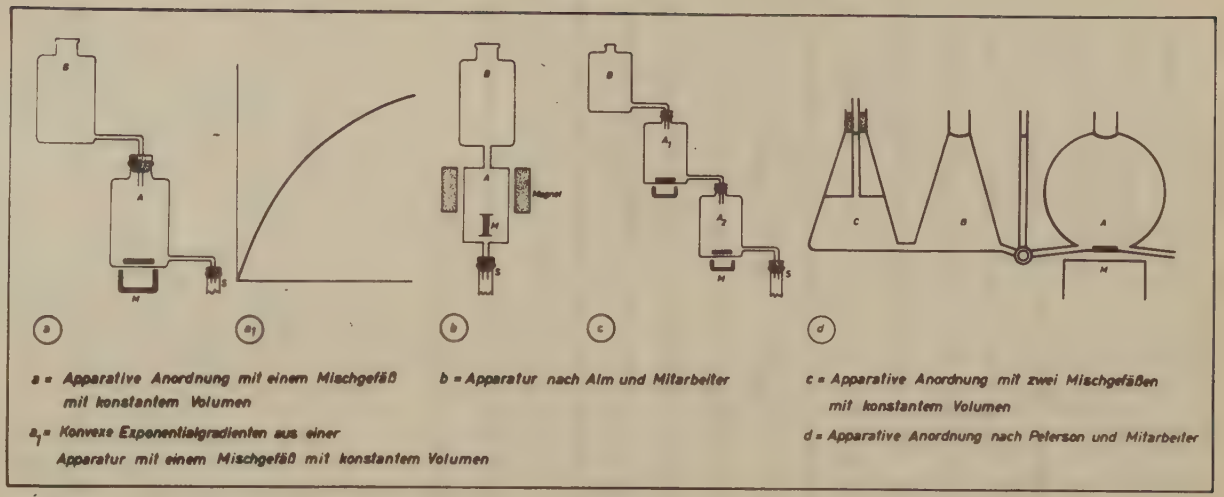


Abbildung 6

Apparative Anordnung zur Herstellung von Gradienten.
a)Konstante Volumen im Mischgefäß, a_1)Konvexe Exponentialgradienten aus einer Apparatur mit einem Mischgefäß mit konstantem Volumen.
b) Apparatur nach Alm, Williams und Tiselius.
c) Zwei Mischgefäße mit konstantem Volumen
d) Apparatur nach Peterson, Wyckoff und Sober.

keit.Am Ergänzungsgefäß B wird ein Druck angelegt.Der Puffer fließt sodann aus Gefäß B in A und nach der Durchmischung in die Trennsäule.Verschiedene Gradienten können durch Variation des Gehaltes der Ausgangslösung und der Vulumina der beiden Gefäße erzeugt werden.Man kann auch zwei Mischgefäße mit konstantem Volumen verwenden(Abb.6c).Der Grenzpuffer,der sich in dem Ergänzungsgefäß befindet,fließt in das Mischgefäß 1 und von da in das Mischgefäß 2 -dann in die Trennsäule.Beide Mischgefäße sind jeweils mit einem Magnetrührer ausgestattet.Die Puffer in den Mischgefäßen 1 und 2 können sowohl verschieden als auch identisch sein.Mit dieser apparativen Anordnung können verschiedene Formen des Gradienten erzeugt werden(konvexe,lineare,gedehnt s-förmige).Die Konvexität ist bei dieser Anordnung weniger ausgedehnt als bei Apparaturen mit einem einzigen Mischgefäß mit konstantem Volumen.

G e i ß (69) gibt eine Apparatur an,die aus zwei Ergänzungsgefäßen mit verschiedenem Querschnitt und einem Mischgefäß konstanten Inhalts besteht.Das Mischgefäß ist oben abgeschlossen. Die beiden Zuläufe der Ergänzungsgefäße endigen über dem Flüssigkeitsspiegel des Mischgefäßes in dem abgeschlossenen Luftraum. Wenn aus dem Mischgefäß Puffer in die Trennsäule fließt,so entsteht ein Unterdruck,der ein Nachfließen von den beiden Ergänzungsgefäßen aus zur Folge hat.Durch Wahl unterschiedlicher Misch- und Ergänzungsgefäße können verschiedenartige Gradienten erzeugt werden.

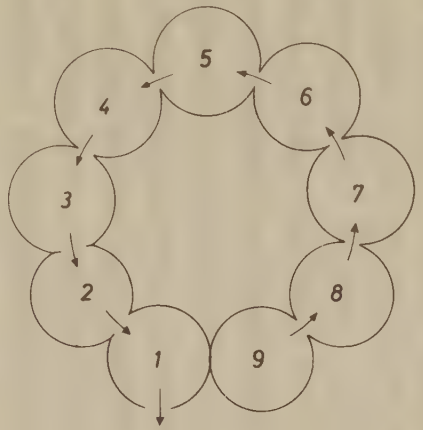
Eine apparative Vorrichtung,die sich besonders gut bei der chromatographischen Trennung der Serumproteine bewährt hat,besteht aus zwei 75o ml-Erlenmeyerkolben B und C und einem 2 Ltr.Florence-Kolben(155)(Abb.6d).Der Florence-Kolben fungiert als

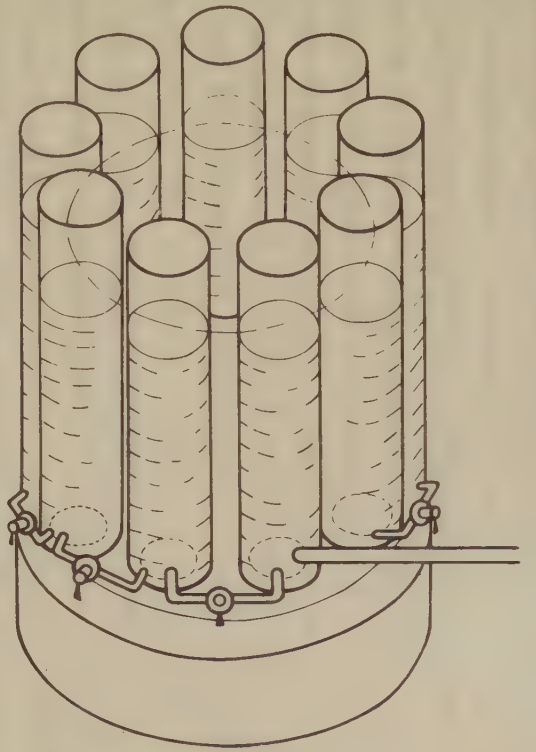
Misch gefäß und ist sowohl mit der Trennsäule als auch mit dem Erlenmeyerkolben B verbunden. Ein Magnetrührer sorgt für gute Durchmischung im Florence-Kolben. Der Erlenmeyer-Kolben B ist auch mit dem Kolben C verbunden. Letzterer ist oben mittels eines Stöpsels verschlossen, der eine Öffnung zum Durchlaß einer Glaskapillare enthält. Die Eintauchtiefe der Glaskapillare in das Gefäß C ist variabel. Das Gefäß A (Florence-Kolben) enthält den zu Anfang der Elution zu verwendenden Puffer und die beiden Gefäße C und B beiinhalten den Grenzpuffer, also den Puffer mit der höchsten Konzentration. Alle Gefäße sind in der gleichen Ebene angebracht. Anfänglich ist die Verbindung zu Gefäß A geschlossen.

Beim Füllen des Kolbens B mit Grenzpuffer steigt der Flüssigkeitsspiegel in dem Gefäß C durch die offene Verbindung zunächst bis zum Ende der Glaskapillare und dann in der Glaskapillare so weit an, bis das hydrostatische Gleichgewicht mit dem Gefäß B hergestellt ist. Durch Verschieben der Glaskapillare nach oben oder nach unten ist es also möglich, den Flüssigkeitsgehalt des Gefäßes C zu variieren. Das Verhältnis des Anfangs- zum Grenzpuffer wird so gewählt, daß der Pufferspiegel in dem Gefäß A bei geschlossener Hahnverbindung zu B bei Beginn des Versuches dieselbe Höhe aufweist wie der Grenzpuffer in B bzw. die Kapillare in C. Dann wird der Hahnverschluß zwischen A und B geöffnet. Von dem Gefäß A fließt Puffer zur Trennsäule und von dem Gefäß B zu Gefäß A. Zum Ausgleich des hydrostatischen Gleichgewichtes fließt ebenfalls aus dem Gefäß C soviel Flüssigkeit in Gefäß B bis der Flüssigkeitsspiegel in der Kapillare und in dem Gefäß B wieder die gleiche Höhe aufweisen. Diese Menge ist jedoch, da die Kapazität der Kapillare sehr gering ist, sehr klein. Sobald aber

das untere Ende der Kapillare erreicht ist,muß der hydrostatische Ausgleich zwischen den beiden Gefäßen selbst stattfinden.Dieser Punkt entspricht einem Sprung in dem Gradienten.Mittels einfachem Herauf- bzw.Herabschieben der Kapillare in dem Gefäß C ist also sehr leicht eine Modifizierung des Gradienten zu erreichen.Die Gefäße können natürlich sowohl je nach der verwendeten Säulengröße kleiner als auch größer gewählt werden.Bei der chromatographischen Untersuchung von Serumproteinen wird der geeignetste Gradient bei einer Säulengröße von 4o x 2,5 cm dadurch gewonnen,daß man das Gefäß A mit 2ooo - 23oo ml Anfangspuffer füllt und die Glaskapillare so einstellt,daß bei looo-12oo ml Grenzpuffer in beiden Kolben C und B das gleiche Flüssigkeitsniveau wie im Rundkolben hergestellt ist.

Zur Erzeugung einfacher und komplizierter,jederzeit reproduzierbarer Gradienten sind spezielle,sehr leistungsfähige Apparaturen entwickelt worden.Diese sind für jedes beliebige Gesamtvolumen zu verwenden und im Handel erhältlich.So z.B. entwickelten P e t e r s o n und S o b e r (156) eine neunkammerige Apparatur und bezeichneten sie als VARIGRAD.Mit dieser ist es möglich,lineare(mit jedem beliebigen Neigungswinkel) und nichtlineare(konkave,konvexe und mehrfach gekrümmte) Gradienten zu erzeugen,als auch jederzeit einen linearen in einen nichtlinearen Gradienten überzuführen.Dieses Gradienten-Mischgerät besteht aus 9 zylindrischen bzw.quadratischen Kammern,die untereinander durch Verbindungskanäle mit Hahnverschlüssen verbunden sind. Eine schematische Darstellung derartiger apparativer Vorrichtungen zeigt Abbildung 7.Die Gesamtkapazität an Puffervolumen kann sehr unterschiedlich sein und beträgt bei den im Handel befind-





Schematische Darstellung der Apparatur zur Erzeugung kontinuierlicher Gradienten nach Peterson und Sober (VARIGRAD)

Abbildung 2

Schematische Darstellung der Apparatur zur Erzeugung kontinuierlicher Gradienten(Varigrad)nach Peterson und Sober.

lichen Apparaturen zwischen 43o und 34oo ml.In Deutschland sind zwei VARIGRAD-Modelle 13o bzw.3oo mit einem Volumen von 1,3 bzw. 3,o Ltr.erhältlich(Hersteller:BOSKAMP-Gerätebau KG,53o4 Hersel bei Bonn).

Durch Verschließen bzw.Öffnen der Verbindungshähne können die Kammern in beliebiger Zahl zu einer funktionellen Einheit zusammengeschlossen werden.Der Vorteil der deutschen Bauweise gegenüber der beim runden Aufbau räumlich beschränkten amerikanischen ist,daß die Zahl der aneinanderfügbaren Kammern beliebig erweitert werden kann.

Bei Herausfließen des Puffers aus Kammer 1 auf die Säule kommt es zu einem Nachströmen von Flüssigkeit aus allen in dem System miteinander verbundenen Kammern(hydrostatisches Gleichgewicht). Bei einem 2-kammerigen System entsteht ein aufsteigender linearer Gradient,wenn sich der Grenzpuffer im zweiten Gefäß und ein absteigender linearer Gradient,wenn sich der Grenzpuffer in der ersten Kammer befindet.Bei einem 3-kammerigen System entsteht ein konkaver Gradient,wenn die dritte Kammer mit dem Grenzpuffer gefüllt ist.Ebenfalls konkav,jedoch mit ansteigendem Grad der Konkavität sind die Gradienten,wenn der Grenzpuffer bei 4,5....9-kammerigen Systemen sich in der jeweils letzten Kammer befindet. Die Abbildung 8 zeigt die gewonnenen Gradienten bei unterschiedlicher Zahl der benützten Kammern nach P e t e r s o n und S o b e r(156).Würde die Kammer mit der Grenzkonzentration nicht das letzte bzw.erste Gefäß einer Reihe darstellen,sondern an einer anderen beliebigen Stelle stehen,so entstehen anders geformte Gradienten.Werden in einem System nicht nur ein Grenzpuffer und ein Anfangspuffer verwendet,sondern mehrere in ihrer Konzentration unterschiedliche Puffer,so entstehen zusammenge=

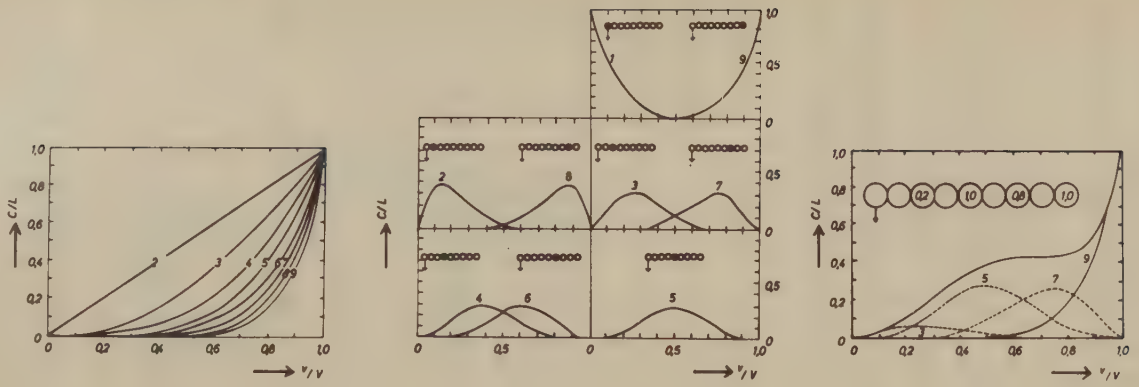


Abbildung 8

Darstellung theoretisch berechneter Gradienten im mehrkammerigen Varigradsys= tem nach Peterson und Sober.
Links:Einfache Gradienten mit Grenzpuffer in der durch die Zahl gekennzeichne= ten Kammer,die zugleich die Kammeranzahl des Systems angibt.
Mitte:Einfache Gradienten mit Grenzpuffer in den durch schwarz ausgefüllte Rin= ge bezeichneten Kammern.
Rechts:Zusammengesetzte Gradienten,wobei sich in den Kammern verschiedene oder graduell abgestufte Puffer befinden.

setzte Gradienten mit wellenförmigem Verlauf.Alle diese Möglichkeiten sind aus der gleichen Abbildung zu ersehen.
Es wird in der Literatur häufig die Konzentration der einzelnen Kammern in Prozent des Grenzpuffers angegeben.So z.B.c%,o%,2%, 5%,loo%.Das bedeutet,daß die ersten zwei Gefäße nur den Anfangspuffer,die Kammer drei 2%,die Kammer vier 5% von dem Grenzpuffer enthält.Die 5.Kammer enthält somit nur den Grenzpuffer.Die Gradienten können somit theoretisch im voraus berechnet werden,jedoch ist es zweckmäßig,sie experimentell zu bestimmen.Der gewonnene Gradient ist dann jeder Zeit reproduzierbar.

Eine andere Apparatur,die an Stelle des Ergänzungsgefäßes eine Injektionsspritze benützt,wurde von W e s t e r g r a d(238) beschrieben.Da man bei dieser Anordnung die Fließgeschwindigkeit der Injektionsspritze,die den Grenzpuffer enthält,ändern kann, ist es auch mit dieser Apparatur möglich,alle Formen von Gradienten zu erzielen.Besonders gut hat sich diese Apparatur bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Trennsäulen (z.B.als Vergleichssäulen)bewährt.Für 4 Trennsäulen wird die Fließgeschwindigkeit der Injektionsspritze auf den 4-fachen Wert eingestellt und das Mischgefäß von vornherein mit 4-fachem Volumen an Anfangspuffer gefüllt.Durch einen Verteiler kann die abfließende Menge aus dem Mischgefäß zu allen 4 Trennsäulen gleichzeitig geführt werden.So werden alle 4 Säulen gleichzeitig mit dem gleichen Gradienten eluiert und die gewonnenen Elutionsmuster sind mit denen der Einzelsäulen vergleichbar.Das ist besonders wertvoll für Vergleichsuntersuchungen zweier oder mehrerer pathologischer Seren untereinander und mit Normalseren.Für mikroanalytische Untersuchungen bedient man sich am besten entweder der von

L a w s o n und P u r d i e (125) beschriebenen apparativen Anordnung oder der von T u r b a(231) entwickelten Apparatur. Bei ersterer handelt es sich um zwei kommunizierende Gefäße, deren Durchmesser 8 mm beträgt und bei letzterer um ein 9-kammeriges System nach dem Prinzip des Varigrades.

Für Proteinanalysen hat die Firma BECKMAN Instruments G.m.b.H. München Freimann,in ihrem SPECTROCHROM eine Gradientenpumpe-Modell 131-eingebaut.

Der Gradient kommt durch den Funktionsablauf einer drei-Zylinder-Pumpe zustande.Jeder Zylinder der Standard-Gradienten-Pumpe faßt 1 ml.Der Programmzylinder dient zur Aufnahme des Puffers, mit dem der Lauf begonnen wird.Es wird unmittelbar durch Abgreifen der Programmierscheibe gesteuert.Sein Flüssigkeitsausstoß ändert sich während des Laufs in Abhängigkeit des vorgegebenen Gradientenprogrammes.In dem Mischzylinder wird der Startpuffer mit dem sogenannten Limiting-Puffer gemischt.Der Mischanteil des Limiting-Puffers wird durch die vom Programmzylinder vorgegebene Startpuffermenge bestimmt.Dabei wird automatisch Limiting-Puffer bis zur vollständigen Füllung des Mischzylinders zugegeben.Im dritten Zylinder,dem Ausflußzylinder,wird die angefallene Flüssigkeitsmenge ausgestoßen.Dadurch erhält man einen kontinuierlichen Fluß der Gradientenpumpe.Der Programmzylinder und der Mischzylinder,die miteinander verbunden sind,werden von einer Nockenscheibe angetrieben,eine zweite betätigt den Ausflußzylinder.Jede Zylindereinheit besteht aus Zylinder,Kolben und Leitung.Am Ende des Kolbens befindet sich eine Gummidichtung. Da sich der Kolben während des Pumpvorgangs auf und ab bewegt, preßt sich der Dichtungsring gegen die glattgeschliffene Innenwand des Zylinders und gewährleistet so eine vollkommene Ab=

dichtung.
Synchron zum Arbeitsablauf der Zylinderbauteile laufen zwei routierende Glas-Teflon-Ventile,die durch den Antriebsmotor betrieben werden.Der Puffer aus den beiden Vorratsbehältern gelangt durch diese routierenden Ventile in die Gradienten= pumpe.Dadurch wird der Strömungsablauf zwischen den drei Pumpen= zylindern bewerkstelligt.Durch die Programmierschablone,die durch auswechselbare Zahnradpaare mit der Pumpe synchron läuft, lassen sich beliebige Zweikomponentenmischungen darstellen. Durch Variation der Pumpengeschwindigkeit und durch Verwendun= gen verschiedener Zahnradpaarungen,die die Zeitachse der Pro= grammierscheibe verändern,lassen sich Gradienten von 8 bis 48o ml/Stunde mit einer Reproduzierbarkeit von $\pm$ 2% gegen einen Druck von loo ps einer Programmlänge bis 48 Stunden erzielen.

3.1.2.2 Berechnung der Gradienten

Die Berechnung des Gradienten gestaltet sich je nach der ver= wendeten Apparatur verschieden.Zweckmäßig ist es,den zu einer bestimmten Elution verwendeten Gradienten experimentell zu be= stimmen,z.B.durch Leitfähigkeit oder/und pH-Messungen des Eluats.Wenn ein Gemisch mit verschiedenen Komponenten zum ersten Male chromatographisch getrennt werden soll,so wählt man am be= sten einen linearen Gradienten,der nachher - je nach dem Trenn= erfolg - in gewünschter Weise geändert werden kann.

Zur Berechnung des Konzentrationsgradienten bei einer Apparatur mit zwei kommunizierenden Gefäßen,bei denen das Verhältnis des Volumen im Mischgefäß und Ergänzungsgefäß immer konstant bleibt,

verwendet man am besten die Gleichung nach B o c k und L i n g (14),

$$c = c_2 - (c_2 - c_1) \ (1 - v) \ \frac{A_2}{A_1}$$

in der c_2 = die Konzentration des Grenzpuffers

c = die Eintrittskonzentration des Elutionsmittels in die Trennsäule

c_1 = die Konzentration der Lösung im Mischgefäß

A_1 = die Kapazität des Mischgefäßes

A_2 = die Kapazität des Ergänzungsgefäßes

v = Verhältnis des abgeflossenen Volumens des Ergänzungsgefäßes zum Gesamtvolumen

darstellt.

Aus der Gleichung geht hervor,daß der gewonnene Gradient linear ist,wenn das Verhältnis der beiden Gefäße zueinander 1:1 beträgt.

Die Berechnung des Konzentrationsgradienten bei Apparaturen,die mit einem konstanten Volumen im Mischgefäß arbeiten,erfolgt nach der Ableitung von A l m,W i l l i a m s und T i s e l i= u s(3)

$$\frac{v}{V} = 2{,}303 \quad \log \quad \frac{x}{X-x}$$

in der x = Konzentration der Lösung im Mischgefäß,nachdem ein Volumen v in die Säule abgeflossen ist,

X = Konzentration der Lösung im Ergänzungsgefäß

V = Volumen des Mischgefäßes

darstellt.

Die entstehenden Gradienten sind umso steiler,je kleiner die Volumina des Mischgefäßes sind.Auch von anderen Autoren sind verschiedene Gleichungen zur Berechnung der Gradienten bei

diesem System angegeben worden, so z.B. von M a d e r (132) B o c k und L i n g (14) sowie von C h e r k i n, M a r t i n e z und D u n n (22).

Für die Berechnung des Konzentrationsgradienten bei einer Anordnung von zwei Mischgefäßen gleichen Volumens und einem Ergänzungsgefäß gilt die unten stehende Formel :

$$c = c_3 - (c_3 - c_1)\,\frac{v}{V_1} e^{-\frac{v}{V_1}} - (c_3 - c_2)\, e^{-\frac{v}{V_1}}$$

Wenn die beiden Mischgefäße verschiedene Volumina aufweisen, bedient man sich der Gleichung :

$$c = c_3 - \frac{V_1}{V_1 - V_2}\,(c_3 - c_1)\, e^{-\frac{v}{V_1}} - \left(\frac{c_3 V_2 - C_1 V_1}{V_1 - V_2} - c_2\right) e^{\frac{v}{V_2}}$$

in der C = die Konzentration des Elutionsmittels in der Trennsäule

c_3 = die Konzentration der Lösung im Ergänzungsgefäß

c_1 = die Konzentration der Lösung im 1.Mischgefäß

c_2 = die Konzentration der Lösung im 2.Mischgefäß

v = das in die Trennsäule abgeflossene Volumen

V_1 = das gleiche Volumen eines der beiden Mischgefäße in der 1.Gleichung und das Volumen des 1.Mischgefäßes in der 2.Gleichung

V_2 = das Volumen im 2.Mischgefäß

dargestellt.

Für die theoretische Berechnung der mittels G e i ß 'scher Apparatur (69) gewonnenen Gradienten bedient man sich folgender Formel :

in der V_m = das Volumen im Mischgefäß

c = die Konzentration im Mischgefäß

V_o = das Gesamtvolumen der beiden Ergänzungsgefäße

c_o = die Anfangskonzentration im Mischgefäß

V = ausgeflossenes Volumen

darstellt.

Die Konzentration c,die zu eirgendeinem beliebigen Zeitpunkt aus dem Varigrad bei Verwendung eines einfachen Systems (die Puffer mit der Grenzkonzentration am Ende oder Anfang einer Rei= he von Gefäßen,die zu einer Funktionseinheit zusammengeschlos= sen sind) abfließt,ist durch Gleichung

$$\frac{c}{L} = \left(\frac{v}{V}\right)^{N-1}$$

gegeben.Darin ist L = die Konzentration des Grenzpuffers

v = das abgeflossene Volumen von Puffer an diesem Punkt

V = das Gesamtvolumen des Puffers

N = die Anzahl der verwendeten Kammer in dem System.

Würde der Grenzpuffer sich nicht im ersten oder letzten Gefäß befinden,sondern in einer anderen beliebigen Kammer,dann würde der Gradient nach folgender Gleichung berechnet werden :

$$\frac{C}{L} = \frac{(N-1)\ !}{(N-n)\ !\ (n-1)\ !}\ (1 - \frac{v}{V})^{N-n}\ (\frac{v}{V} -)^{n-1}$$

Dabei bedeutet N = die Anzahl der zu einer Funktionseinheit zusammengefaßten Kammern

n = die Reihennummer der Kammer mit dem Grenz= puffer

Daraus ist zu ersehen,daß ein symetrischer Gradient dann entsteht,wenn sich der Grenzpuffer in der Mitte eines Systems befindet.In allen anderen Fällen entsteht immer ein unsymetrischer Gradient.

P e t e r s o n und S o b e r (156) geben die errechneten Werte $\frac{c}{L}$ als Funktion von $\frac{v}{V}$ bei verschiedenen Systemen und allen Variationsmöglichkeiten des Grenzpuffers in einer Tabelle an. Theoretisch errechnete und graphisch dargestellte Gradienten bei Einfüllen einer beliebigen Kammer mit Grenzpuffer in einem 9-kammerigen System waren weiter oben - Abbildung 8 - wiedergegeben worden.Wenn mehrere Puffer mit unterschiedlicher Konzentration verwendet werden,ist der gewonnene Gradient eine Summation mehrerer einfacher Gradienten,wie aus der gleichen Abbildung gut zu ersehen ist.

Zur Berechnung des pH-Gradienten ist ganz allgemein zu sagen, daß sie sich theoretisch viel schwieriger gestaltet,als die Salzkonzentration und zwar deshalb,weil es sich hier nicht nur um logarhytmische Funktionen handelt,sondern auch,weil die Protonen - Aktivität von den Fremdionen und deren Pufferwirkung abhängt.Am besten wird sie deshalb empirisch bestimmt und zwar durch pH-Messung im Eluat.Wir verzichten hier auf die Behandlung dieses Themas und verweisen auf die grundlegende Arbeit von P i e z (159).

3.1.2.3 Empirische Bestimmung der Gradienten

Es ist zweckmäßig,Salz-oder/und pH-Gradienten bei jedem chromatographischen Versuch durch Leitfähigkeit= und pH-Messung in den einzelnen chromatographischen Säulenfraktionen empirisch zu be=

stimmen und graphisch in der Weise aufzuzeichnen,daß die ermittelten pH- oder/und Leitfähigkeitswerte der einzelnen Fraktionen auf der Ordinate und die Zahl der Säulenfraktionen auf der Abszisse aufgetragen wurden.

Es muß jedoch darauf hingewiesen werden,daß die Leitfähigkeit nicht nur von der Ionenkonzentration abhängig ist,sondern auch von der Natur bzw.der Gestalt und Ladung der Ionen sowie von der Viskosität und der Temperatur der Lösung beeinflußt wird. Der durch die Leitfähigkeitsmessung in dem Eluat gewonnene Gradient entspricht nicht den tatsächlichen Puffergradienten v o r der Säule,da für die Leitfähigkeit im Eluat nicht nur die Konzentration der Ionen des Puffers,sondern auch die der austretenden Komponenten maßgebend ist.

3.1.2.4 Der Einfluß des Gradienten auf die Elution

Auf die Behandlung der theoretischen Grundlagen der Gradientenelution wird hier bewußt verzichtet,da einerseits die bisher erzielten Ergebnisse nicht völlig befriedigen und sich nicht in allen Fällen verallgemeinern lassen und andererseits den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würden. Eine ausführliche Behandlung dieses Themas findet sich bei A l m s,W i l l i a m s und T i s e l i u s (3),F r e i l i n(64,65),D r a c k e(42) und S c h w a b,R i e m a n und V a u g h a n (2oo).
An dieser Stelle soll nur kurz die Einwirkung der Gradienten auf die Elution besprochen werden.Wenn die Werte der Verteilungskoeffizienten K zweier zu trennender Substanzen weit auseinander liegen,würden auch die Elutionsbanden dieser Substanzen bei einer

einfachen Elution weit auseinander zu liegen kommen.Wird jedoch ein Gradient mit steigender Salzkonzentration benutzt,so wird die nachfolgende Komponente viel schneller durch die Säule bewegt, da eine Steigerung der Konzentration des Eluens eine Verkleinerung des Verteilungskoeffizienten und eine Vergrößerung der Bodenhöhe zur Folge hat.Somit rücken die beiden Banden aneinander und die Gesamtzeit zur Entwicklung des Chromatogramms wird abgekürzt.Ist der Gradient zu steil und die Unterschiede in den K-Werten zweier Komponenten nicht sehr groß,so droht jedoch die Gefahr der Vermischung.Über die Wirkung der Konzentration des Eluens auf die Wanderungsgeschwindigkeit und die Trennschärfe läßt sich folgendes sagen :je konzentrierter das Eluens ist, umso geringer wird der Verteilungskoeffizient;je geringer der Verteilungskoeffizient,desto schneller wandern die Banden und desto größer wird die Bodenhöhe.Von der Höhe und Zahl der effektiven Böden in der Säule hängt jedoch die Trennschärfe ab.Haben zwei zu trennende Komponenten einen Trennfaktor $a = \frac{k}{K} = 1$ und würden die Verteilungskoeffizienten der beiden Substanzen durch den verwendeten Gradienten gleichsinnig verändert,dann können diese Substanzen nicht voneinander getrennt werden.Verändert der verwendete Gradient jedoch die beiden Verteilungskoeffizienten gegensinnig,dann wird allerdings eine Trennung möglich. Die Verteilungskoeffizienten bzw. der Trennfaktor $a= \frac{k}{K}$ zweier Substanzen bildet die Grundlage des gesamten chromatographischen Vorganges.Der Verteilungskoeffizient k ist nicht nur von der Salzkonzentration des Eluens abhängig,sondern auch von seinem pH bzw. von der Wasserstoffionen-Konzentration.Nimmt z.B.der K-Wert mit steigender Säurekonzentration ab,so bewirkt eine Steigerung der Säurekonzentration eine Abnahme der Schwanzbildung.

Außerdem ist jedoch auch der Einfluß der Salzkonzentration und der pH-Wert des Eluens auf den Austauscher bzw.auf die Austauscher-Kapazität nicht zu vernachlässigen.Ein Anionenaustauscher hat z.B. seine größte nutzbare Kapazität im basischen Bereich und ein Kationenaustauscher im sauren Bereich.Je saurer das Eluens bei einem Anionenaustauscher wird,umso geringer wird seine nutzbare Austauscherkapazität und umso schneller wandern die Banden in diesem pH-Bereich.Umgekehrt verhält es sich bei einem Kationenaustauscher.Es ist jedoch zu betonen,das der Einfluß der Salzkonzentration auf den gesamten chromatographischen Vorgang größer ist,als der des pH-Wertes.Bei einem o,3 M Natriumphosphatpuffer pH 8,o wandert fast die gesamte aufgetragene Serummenge in einer einheitlichen Front und es ist ohne weiteres möglich eine Trennung mittels eines Salzkonzentrationsgradienten (o,o1 - o,3 Mol) bei konstantem pH durchzuführen.

Das Aussehen einer chromatographischen Bande hängt von der ihr zugrunde liegenden Isotherme und damit wiederum von dem Verteilungskoeffizienten K der zu chromatographierenden Substanzen ab. Daraus ergeben sich drei Formen der Elutionsbande,je nach der zugrunde liegenden Isotherme und zwar eine symetrische und zwei unsymetrische.Bei den letzteren handelt es sich um eine Elutionsbande mit scharfer Vorderfront oder scharfer Rückfront.Bei der scharfen Vorderfront spricht man auch von der Schwanzbildung, da das Ende der Elutionsbande diffus ist.Durch Verwendung eines Gradienten mit steigender Salzkonzentration wird die Gefahr der Schwanzbildung geringer,da der Verteilungskoeffizient,wie schon erwähnt,abhängig von der Konzentration des Elutionsmittels ist.

Durch die Verwendung verschiedener Gradientenformen bei Gleich=
bleiben des Anfangs- und Grenzpuffers (z.B.o,ol Mol Natriumphos=
phatpuffer pH 8 und o,3 Mol Natriumphosphatpuffer pH4,5) ge=
winnt man bei der chromatographischen Untersuchung der Serum=
proteine unterschiedliche Elutionsmuster.

Für die Durchführung von säulenchromatographischen Untersuchungen mit Hilfe der Gradientenelutionschromatographie können folgende allgemeine Hinweise gegeben werden:

1.Bei Verwendung eines Anionenaustauschers als Säulenpackung ist eine ansteigende Salzkonzentration (o,oo5 oder o,ol Mol------o,3 oder o,7 Mol)und ein abfallender pH-Gradient(9 oder 8 ---4,5)zu verwenden.

2.Bei einem Kationenaustauscher als Säulenfüllung kommt ein an=
steigender Salzkonzentrations- und absteigender pH-Gradient
zur Verwedung.

3.Bei beiden Austauschern kann ein Gradient mit ansteigender Salz=
konzentration bei konstantem pH verwendet werden.

4.Sind zwei Komponenten mit sehr ähnlichen chromatographischen Eigenschaften (z.B.solche,deren Faktor nahe 1)zu trennen,dann ist ein sehr flacher (je nach der Fragestellung linearer,konka=
ver oder konvexer Gradient zu verwenden)Es sei denn,man verwen=
det solche Gradienten,die die Eigenschaften der zu trennenden Ionen gegenseitig zu beeinflussen vermögen.

5.Ein steiler Gradient ist dann anzuwenden,wenn die beiden zu trennenden Ionen in ihren chromatographischen Eigenschaften sehr voneinander differieren bzw.wenn aus den Vorversuchen be=
kannt ist,daß die beiden chromatographischen Peaks sehr weit auseinander liegen.

6.Sind mehrere Komponenten voneinander zu trennen(z.B.Serum= proteine),die teils in ihren chromatographischen Eigenschaften große Unterschiede auffweisen und teils einander sehr ähnlich sind, dann kommt eher ein gekrümmter Gradient in Frage.Dieser ermög= licht eine optimale Anpassung der Elution an jede Komponente der Lösung.

7.Ein konvexer Gradient ist dann notwendig,wenn die Komponenten des Gemisches,die als erste eluiert werden,einen größeren Trenn= faktor haben als diejenigen,die am Ende des Chromatogramms elu= iert werden.Im umgekehrten Fall verwendet man einen konkaven Gradienten.

8.Je steiler der Gradient ansteigt,umso schärfer ist der chroma= tographische Peak und damit die Konzentration der eluierten Sub= stanz.Die Schwanzbildung ist in diesem Falle auch geringer. Bei steilen Gradienten ist jedoch,wie schon erwähnt,die Gefahr der Vermischung der Komponenten groß!

9.Das Gelingen einer chromatographischen Trennung hängt nicht nur von der Anfangs- und Endkonzentration des verwendeten Puffers, die die beiden Enden des Gradienten bestimmen,sondern auch von der Form des Gradienten ab.Ändert sich die Form des Gradienten bei verschiedenen Versuchen,so ändert sich auch das Elutionsmu= ster.

3.1.3 Diskontinuierliche Gradientenelution

Die schritt-bzw. stufenweise Elution ist eine Abart der Gradien= tenelutionschromatographie und wird häufig in der Proteinchemie verwandt (201,202,210,227).

Das Prinzip der Methode besteht darin,daß die Veränderung des Eluens im Verlauf des chromatographischen Versuches nicht konti=

nuierlich durch Zusammenmischen von Puffern vorgenommen wird, sondern daß verschiedene Puffer scharf abgegerenzt gegeneinander gewechselt werden.Wenn also durch Vorversuche bekannt ist,daß die erste Komponente eines Gemisches bei einer bestimmten Salzkonzentration oder/und bei einem bestimmten pH-Wert und eine weitere Komponente bei einem anderen Puffer eluiert werden kann,wird der zweite Puffer erst auf die Säule gebracht,nachdem der durch den ersten Puffer eluierbare Anteil erschöpfend desorbiert ist. In gleicher Weise können mehrere Puffer nacheinander benützt werden.Die Zonen werden bei diesem Verfahren schärfer und die Komponenten treten konzentrierter aus der Säule als bei der kontinuierlichen Gradientenelutionschromatographie.Wichtig ist bei diesem Verfahren die Auswahl der Puffer,ihre Zusammensetzung, ihre Reihenfolge und ihr Volumen.Mehr als bei anderen Verfahren bedarf es einer Reihe von Vorversuchen um die speziellen Desorptionsbedingungen für bestimmte Komponenten zu ermitteln.Es ist anzunehmen,daß gerade dieses Verfahren in Zukunft noch größere Bedeutung erlangen wird.

Für die Durchführung chromatographischer Arbeiten mit schrittweiser Elution mittels eines diskontinuierlichen Gradienten hat K n e d e l [118] (119) eine Apparatur entwickelt,die unter der Bezeichnung VARISCAN (Hersteller :BOSKAMP -Gerätebau KG,5304 Hersel bei Bonn) nunmehr zur Verfügung steht.Diese ermöglicht den Wechsel der verschiedenen Puffer automatisch.
Dieser Apparat ist ein elektronisch gesteuertes und mit Dekadenvorwahlzählung ausgestattetes System von 8 Puffergefäßen mit einer Magnetventil - Vorrichtung.Nachdem die Durchflußgeschwindigkeit bei einem chromatographischen Versuch konstant ist,

kann die Zeit,die jeder von den 8 Puffern laufen soll,vorbe= stimmt und an der Apparatur eingestellt werden.Dann läuft der gesamte Vorgang automatisch ab,d.h. nach Ablauf der eingestell= ten Zeiten werden die verschiedenen Puffer aus den Kammern ab= gegeben und der Säule zugeführt.

3.1.4 Säule

Die Säule mit ihrer Füllung bildet das Kernstück des säulenchro= matographischen Verfahrens und hat einen großen Einfluß auf die Trennung.Das Säulenvolumen bestimmt die Menge des zu untersuchen= den Stoffes und somit auch das Volumen des Elutionsmittels,die Menge des Adsorptionsmittels und die Arbeitszeit.Die Dimensio= nen der Säule sind maßgebend für die Schärfe der Fronten und für die Durchflußgeschwindigkeit.Bei zu kurzen Säulen mit geringerem Schlankheitsgrad ist die Durchflußgeschwindigkeit größer als bei zu langen mit großem Schlankheitsgrad.
Wie aus den theoretischen Überlegungen hervorgeht,ist die Trennung umso besser je kleiner die Bodenhöhe und je größer die Zahl der theoretischen Böden einer Säule ist.Die Breite einer eluierten Bande nimmt mit der Anzahl der theoretischen Böden der Trennsäule ab.Eine Verlängerung der Säule bei gleichbleibendem Durchmesser verschiebt die Austauschkurve,wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist,nach rechts und erhöht somit die Durchbruchkapazität und die Gesamtkapazität.Der Strömungswiderstand wird jedoch größer, und es wird auch mehr Austauschermaterial benötigt.Auch bei gleicher Menge Austauschermaterialien ist eine bessere Trennung durch eine Säule von großem Schlankheitsgrad zu erzielen,da das Volumen der Übergangszone kleiner ist.(8,183,184)

Jedoch sind in der Auswahl der Säule in der Praxis Grenzen gesetzt, und es können nicht beliebig lange bzw.schlanke Säulen verwendet werden,da einerseits zu hohe Säulen mehr zur Randgängigkeit und Kanalbildung neigen,und die Erzielung einer gleichmässigen Packung viel größere Schwierigkeiten bereitet,andererseits kann die Durchflußgeschwindigkeit infolge der Zunahme des Strömungswiderstandes so zunehmen,daß ein Durchfluß nicht mehr stattfindet.Außerdem ist die Erzielung eines gleichmäßigen Durchflusses während einer langen Versuchszeit viel schwieriger als bei weniger schlanken und hohen Säulen.Das Verhältnis von Höhe zum Querschnitt beträgt bei den meist verwendeten Säulen in der Proteinchemie 1:1o bzw.1:2o,(1-2 cm Durchmesser und 2o -4o cm Länge).Jedooh sind auch Säulen von 1o m Länge und mehr mit gutem Erfolg verwendet worden.

Als Faustregel kann gelten : Bei Untersuchung eines Gemisches mit geringerer Zahl von Komponenten,von denen einige nur in kleinster Menge vorhanden sind,eine Säule mit größerem Schlankheitsgrad bevorzugt.

In der Literatur sind zahlreiche Säulen beschrieben.Aus praktischen Gründen und für spezielle Arbeiten wurden neue Säulen entwickelt.Man kann auch einfache Säulen im Laboratorium selber herstellen.Das untere Ende einer Glasröhre wird für diesen Zweck mit einer Siebplatte und einem Filterscheibchen versehen.Abb.9 zeigt einige Austauschersäulen.Im Prinzip bestehen sie alle aus einem geeignet bemessenem Rohr aus Glas,Quarz,Kunststoff oder Metall,das am unteren Ende eine Bodenfritte zum Tragen des eingefüllten Materials besitzt.

Es ist wie schon erwähnt, einerseits die chromatographische Trennung zweier Substanzen umso vollkommener je schlanker und länger die Säule ist, andererseits ist durch starke Zunahme des Strömungswiderstandes bei eben solchen Säulen die Durchflussgeschwindigkeit stark vermindert.

Durch Hintereinanderschaltung mehrerer Trennsäulen (Abb.9e) wird eine Verlängerung der effektiven Säulenlänge ohne Erhöhung des Strömungswiderstandes erreicht. Ausserdem bereitet das Füllen der Säule keine Schwierigkeit, da die einzelnen Säuleneinheiten getrennt gefüllt und dann zusammengesetzt werden.

Der gleiche Effekt, wie bei hintereinander geschalteten Säulen kann dadurch erreicht werden, daß man das Eluat, das die beiden zu trennenden Substanzen enthält, gleich nach seinem Austritt aus der Säule mittels einer Vorrichtung wieder durch dieselbe Säule schickt. Der Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden und zwar bis die gewünschte Trennung erreicht ist. Diese Art von Chromatographie wird als Re-cycling Chromatographie bezeichnet und findet besonders bei der Trennung hochmolekularer Substanzen mittels Gelfiltration Anwendung (160). In der Abb. 9b ist der Vorgang schematisch dargestellt.

Bei chromatographischen Verfahren, bei denen eine konstante hohe oder niedrige Temperatur gefordert wird, kann die Säule mit einem sogenannten Temperier- bzw. Kühlmantel versehen werden. Das ist in einfachster Form ein Glasmantel mit Ein- und Auslauf für Wasser wie in Abb. 9g dargestellt ist. Das umfliessende Wasser, das sowohl vorgewärmt, als auch vorgekühlt bzw. seine Temperatur mittels eines Thermostaten konstant gehalten werden kann, hält während des Versuches die gewünschte Temperatur in der

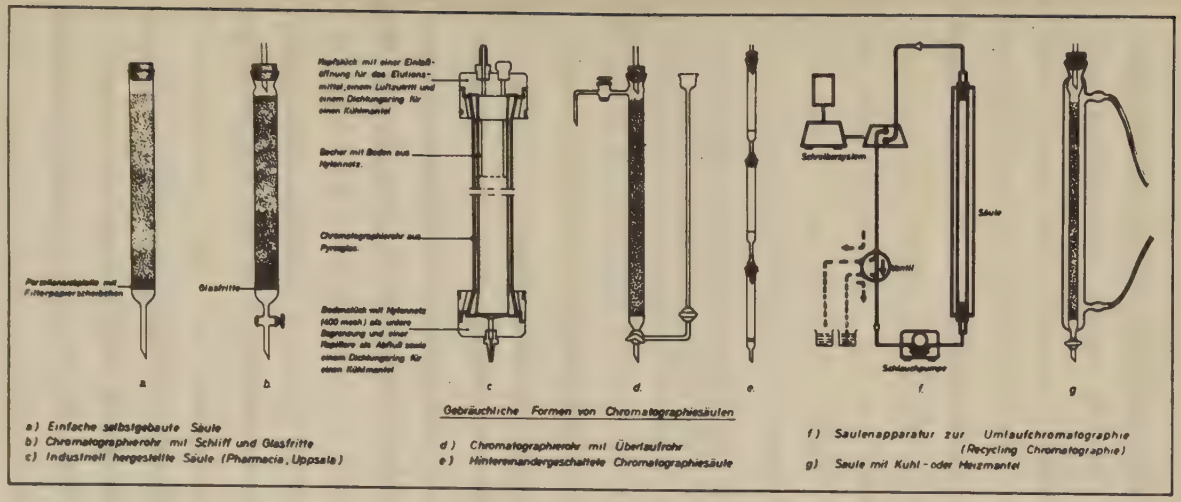


Abbildung 9

Schematische Darstellung von gebräuchlichen Chromatographiesäulen.

Säule aufrecht. Bei Trennung von Fermenten ist es vorteilhaft, wenn man das gesamte chromatographische Verfahren in einem Kühlraum durchführt.

Wir verwendeten Säulen mit verschiedenen Größen und schlankheitsgraden:

40 : 2,2cm , 30 : 1,7 cm, 25 : 1,5 cm, 20 : 1,2 cm, 40 : 2,5 cm, 100 : 2,5 cm, 100 : 1 cm.

Sie waren oben geschliffen und unten mit Glasfritten (G 2) versehen.

3.1.4.1.

Säulenfüllung

Entscheidend für die Auswahl des Füllmaterials der Säule ist die Analysenlösung bzw. die Fragestellung. In der Proteinchemie kommen, wie schon erwähnt hauptsächlich verschiedene Arten der Cellulose-Ionenaustauscher und die verschiedenen Formen des Sephadex bzw. vernetzte Dextrane zur Anwendung.

Um reproduzierbare Ergebnisse bei Arbeiten mit solchen Austauschern zu bekommen, ist es notwendig, die fabrikneuen bzw. frisch hergestellten Austauscher unbedingt vorzubehandeln. Diese Vorbehandlung erfüllt

erstens den Zweck, die zu kleinen bzw. zu grossen Partikel zu entfernen und somit ein Füllmaterial mit annähernd gleich Partikelgrösse herzustellen,

zweitens, den Austauscher sorgfältig "einzufahren" bzw. altern zu lassen und die Artefakte zu entfernen.

Zu 1: Wie dieses zu erreichen ist, haben wir schon auf Seite 45 genau beschrieben.

Zu 2: Nachdem, wie auf Seite 45 beschrieben, der trübe

Überstand, der die kleinen Austauscherpartikel enthält, abgegossen ist, wird das Sediment mit dem in Frage kommenden Grenzpuffer (d.i. der Puffer mit der stärksten Molarität, der bei einem chromatographischen Verfahren zur Verwendung gelangt) auf einer Nutsche bzw. Fritte gründlich gewaschen.
Anschliessend wird genauso verfahren wie beim Waschen bzw. Regenerieren des Austauschermaterials, das auf der Seite 84 beschrieben ist. Abschliessend wird es mit dem zu Anfang der Elution verwendeten Puffer behandelt und annähernd auf das gewünschte pH gebracht. Der so vorbehandelte Austauscher wird dann zum Füllen der Säule verwendet.
Die notwendige Menge der Trägerstoffe richtet sich nach der Grösse bzw. den Dimensionen der Säule sowie der Festigkeit der Packung. Für eine 40 x 2,2 Säule wurde z.B. etwa 30 g Cellulose-Austauscher verwendet.

3.1.4.1. Füllen der Chromatographie-Säule

Auf die chromatographiesche Trennung haben schlechte Packung der Säule oder/und uneinheitlicher Fluss einen sehr grossen Einfluss und zwar infolge von Bildung von Rissen, Entstehen von Randgängigkeit usw. Die Säulen müssen soweit es möglich ist, gleichförmig gepackt sein, da sonst durch nicht ganz einheitlichen Strömungswiderstand der Packung eine Verzerrung der Zonen entsteht, die dann eventuell das Gelingen des chromatographischen Versuches in Frage stellen kann. An den Stellen, wo die Säule nicht so fest gepackt ist, wird die Front infolge des geringeren Widerstandes vorauseilen. Diese Erscheinung, die besonders gut an den Wandungen der Säule zu sehen ist, wird als Randgängigkeit bzw. Kanalbildung bezeichnet. Durch gleichmässiges Füllen der

Säule mit Austauscher einheitlicher Korngrösse wird diese Gefahr herabgesetzt. Wie bei allen säulenchromatographischen Methoden gilt auch hier das gleichmässige Giessen der Säule ohne Luftblasen als Grundsatz. Es sind verschiedene Verfahren zum Füllen des Chromatographierohres in der Literatur beschrieben. Jedes dieser Verfahren eignet sich gut für bestimmtes Füllmaterial. Für den Cellulose-Ionenaustauscher hat sich am besten folgendes Verfahren bewährt:

Von den Austauschern, die wie oben beschrieben vorbereitet sind, wird eine 4 % Suspension hergestellt und in einem Erlenmeyerkolben, der nahe seinem Boden ein Auslaufrohr besitzt gegeben. Ein Magnetrührer sorgt in diesem Gefäß für das ständige Rühren der Suspension. Mittels eines Verbindungsschlauches wird dieses Gefäß mit der Säule verbunden. Die in die Säule einfliessende Suspension sedimentiert allmählich. Die Durchflussrate soll etwa beim Giessen der Säule 1 ml in 15 - 30 Sekunden betragen. Sobald die Durchflussgeschwindigkeit diese Grenze unterschreitet, wird der Erlenmeyerkolben mit einer Druckflasche (am geeignetsten Pressluft) verbunden. Unter allmählich ansteigendem Druck bis 0,7 kg/cm^2 wird die Durchflussrate von 1 ml in 15 - 30 Sekunden konstant gehalten. Nachdem die erwünschte Säulenlänge erreicht ist, wird die Säule abmontiert und mit dem zu Anfang der Elution zu verwendenden Puffer equilibriert und zwar am besten mit der Durchflussgeschwindigkeit, die während des anschliessenden chromatographischen Versuches aufrecht erhalten werden soll.

Es ist wichtig, daß die obere Grenzfläche der Adsorbentsäule während des ganzen Versuches eben bleibt und nicht durch Eintröpfeln der Flüssigkeit die feinen Teilchen aufgewirbelt werden. Das Letztere wird durch Aufbringen eines genau passenden Filter-

papierscheibchens oder durch Anbringen einer im Durchmesser passenden Glaskugel, die auf der Flüssigkeit schwimmt und die abfallenden Tropfen zerteilt, vermieden (152).
Ein Trockenlaufen der Austauschersäule ist unbedingt zu vermeiden; da durch Eindringen von Luft in das Gefüge der gepackten Säule das Gelingen des chromatographischen Versuches in Frage gestellt wird. Diese Gefahr ist bei den, nach dem beschriebenen Verfahren begossenen Säulen nicht sehr groß, da derartige Säulen von selbst selten trocken laufen.

3.1.4.1.1.

Störungen in der Säulenfüllung

Da eine ideale, gleichmässige Packung mit Austauschern einheitlicher Korngrösse kaum möglich ist, können im Verlauf des chromatographischen Versuches Störungen auftreten, die als Randgängigkeit, Kanalbildung und Vermischung lange schon bekannt sind (9,71).
Die Flüssigkeitsschicht wird auf ihrem Weg senkrecht zur Säulenachse durch nicht einheitlichen Strömungswiderstand der Packung (als Folge der nicht ganz gleichmässigen Packung) und an den einzelnen Austauscherkörnern verzerrt. Infolge des geringeren Widerstandes an den Stellen, an denen die Füllung nicht so fest gepackt ist, wird die Flüssigkeit vorauseilen und eine Verbiegung der Fronten verursachen. Die Trennschärfe wird somit nachteilig beeinflusst.
Hohe Durchflussgeschwindigkeit, uneinheitliche Korngrösse und nicht gleichmässige Packung erhöhen die Gefahr der Randgängigkeit und Kanalbildung. Ausserdem hängt die Rangängigkeit und Kanal-

bildung, die übrigens an den Wandungen der Säule besonders gut zu beobachten sind, von dem Quellungszustand der Packung ab. Bei gutem Quellungszustand der Füllung ist sie kaum zu befürchten. Wenn aber während des Versuches der Quellungsstand sich verändert und der Austauscher schrumpft, dann ist die Gefahr der Kanalbildung und Randgängigkeit besonders gross.

3.1.4.1.2.

Waschen und Regenerieren

Die Ionenaustauscher können wiederholt verwendet werden, müssen jedoch nach jedem Versuch zur Entfernung der Restproteine, sowie Lipoide und Karbonationen gewaschen bzw. regeneriert werden.

Das Waschen bzw. Regenerieren der Ionenaustauscher auf Cellulosebasis geschieht wie folgt:

1. Waschen mit etwa 2 x Säulenvolumen Grenzpuffer; das ist der Puffer mit der stärksten Salzkonzentration der in dem Versuch zur Verwendung kommt.
2. Behandlung mit etwa 4 x Säulenvolumen 1/10 n NaOH, um die restlichen in der Säule verbliebenen Proteine zu entfernen.
3. Gründliches Nachwaschen mit Aqua dest. zur Entfernung von Alkali.
4. Behandlung mit 2 x Säulenvolumen 1/10 n HCl, im besondern beim Gebrauch von Anionenaustauschern zur Entfernung von Karbonationen, die manchmal eine artifizielle Zacke verursachen können.
5. Nachwaschen mit Aqua dest. bis die Säure entfernt ist.
6. Equilibrieren mit dem zu Anfang der Elution zu verwendenden Puffer.

Das Waschen bzw. die Regenerierungsprozedur kann in der Säule geschehen. Dieses hat den Vorteil, daß die Säulenfüllung nicht resuspendiert werden muss und ohne weiteres für den nächsten Versuch verwendet werden kann. Der Nachteil besteht dabei jedoch in dem beträchtlichen Zeitaufwand, da die Durchflussgeschwindigkeit im Vergleich zu dem Gesamtvolumen der zum Waschen erforderlichen Flüssigkeiten klein ist. Ausserdem kommt es häufig, bedingt durch starke Milieuänderungen während des Waschvorganges zu Quellungsänderungen des Austauschers, die dann das Gefüge der Packung stören können. Aus diesem Grunde haben wir die Waschprozedur ausserhalb der eigentlichen Trennsäule in einer sogenannten"Waschsäule" durchgeführt. Letztere ist eine 10 x 30 cm grosse Säule, die am Boden dieselbe Glasfritte besitzt wie die eigentlichen Trennsäulen (G2). Das Auslaufrohr wird mit einem Schlauch verbunden. Dieser wird nach oben geführt und zwar so, daß sein horizontaler Teil (Glasrohrzwischenstück) einige Zentimeter oberhalb der Absorbentschicht steht. Das Ende des Rohres wird dann nach unten abgebogen. Die Füllung der Trennsäule wird mit dem Grenzpuffer resuspendiert und in die erwähnte Waschsäule gegeben, und stehen gelassen. Nach einer kurzen Zeit setzt sich der Austauscher ab und bildet eine Schicht am Boden dieser Säule. Dann wird die Waschprozedur genauso durchgeführt wie oben beschrieben. Durch eine Schlauchleitung und Herstellung eines hydrostatischen Gleichgewichtes mit einer Reserveflasche kann man sich das standige Nachgiessen z.B. von Aqua dest. ersparen. Mittels dieser Anordnung ist es möglich, grosse Adsorbentmengen in kürzester Zeit zu waschen, ohne daß der Austauscher dazwischen immer trocken läuft.

3.1.4.1.3.

Aufbewahrung

In geeigneter Lösung aufbewahrt, erleiden die Ionenaustauscher keine Wertminderung und können wiederholt verwendet werden. Die Austauscher, besonders die auf Kunstharzbasis sollen nicht an der Luft aufbewahrt werden, sondern in einer wässrigen Lösung. Die Kationenaustauscher sind im allgemeinen stabiler als die Anionenaustauscher. Die Cellulose- und Kunstharzionenaustauscher, ebenso verschiedene Sephadexarten,neigen besonders zur Schimmelbildung, deshalb ist ein Zusatz von Thymol oder Cialit zu den Lösungen, in denen sie aufbewahrt werden, ratsam. Die Cellulose-Ionenaustauscher können außerdem von Bakterien und Pilzen, die das Ferment Cellulase bilden, angegriffen werden. Aufbewahrt werden die Cellulose-Ionenaustauscher am besten in wässriger Lösung von 0,01 / 0,5 M Natriumphosphatpuffer, mit Zusatz von Cialit, in einem kalten Raum. Ein längerer Kontakt mit Lösungen, die saurer sind als pH 4 soll tunlichst vermieden werden (154). Wir haben monatelang dieselben Cellulose-Ionenaustauscher wieder verwendet,ohne eine Wertminderung beobachtet zu haben.

3.1.5.

Analysenlösung

Die Analysenlösung wird vor der chromatographischen Untersuchung bei 4° Celsius gegen den zu Anfang der Elution zu verwendenden Puffer für die Dauer von mehr als 8 Stunden unter ständigem Rühren dialysiert. Dabei sorgt ein Magnetrührer für das ständige Umrühren der Dialysenlösung. Das Volumen des zur Dialyse verwandten Puffers soll etwa das 15 - 30-fache der Analysenlösung betragen. Nach der Dialyse wird die Analysenlösung - in unserem Untersuchungsgut meist das Serum bzw. das vorfraktionierte Serum - zentrifugiert. Der Überstand wird für die chromatographische Untersuchung verwendet, und das Sediment das im Falle des Serums ein weisses Präzipitat darstellt, wird verworfen. Dieses weisse Präzipitat enthält 0,2 - 3% des Gesamtserumproteins vor der Dialyse. Über seine Zusammensetzung siehe Seite 109 . Die Konzentration der Analysenlösung in g% Eiweiß, die Dimensionen der Säule, sowie die Austauschkapazität des Austauschers entscheiden über das Volumen der aufzutragenden Probe. Für eine gute chromatographische Trennung ist ganz allgemein wichtig, daß die aufgetragene Analysenlösung nicht mehr als 1/5 der Säulenlänge beträgt. Bei zu sehr verdünnten Lösungen ist also eine Konzentrierung vor der chromatographischen Prozedur notwendig. Bei unseren Untersuchungen enthielt die notwendige Serummenge (bei einer Konzentration von 6 - 8g Eiweiß) pro Gramm Cellulose 14 - 30 mg Eiweiß. Jedoch kann auch bis zu 170 mg Eiweiß/g Adsorbent mit gutem Erfolg und Reproduzierbarkeit verwendet werden (210).

3.1.6.

Strömungsgeschwindigkeit

Der verfügbare Überdruck, die Korngröße des Austauschers, die Länge bzw. der Schlankheitsgrad der Säule und die Festigkeit der Packung bestimmen die maximal erreichbare Strömungsgeschwindigkeit. Die Strömungsgeschwindigkeit hat ihrerseits einen großen Einfluß auf die Trennung, und zwar nicht nur ihr absoluter Wert sondern auch ihre Gleichmäßigkeit während der gesamten Entwicklungszeit des Chromatogramms. Ihr maximaler Wert in einem Versuch darf die Austauschgeschwindigkeit einer Packung nicht übersteigen, weil sonst die Ionen nicht mehr Zeit genug zum Austausch haben. Die Fronten werden dann verwischt, da die Austauschgeschwindigkeit nicht gross genug gegenüber der Wanderungsgeschwindigkeit der Fronten ist und der Ausnutzungsgrad abnimmt. Andererseits wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Fronten (außer von der Kapazität des Austauschers und die Konzentration des Zulaufers) im wesentlichen von der Strömungsgeschwindigkeit bestimmt und die Fronten sind umso schärfer je langsamer der Fluss ist. Jedoch sind auch hier in praxi Grenzen gesetzt, weil einerseits bei zu langsamen Durchfluss der Zeitaufwand sich vergrößert, andererseits die Gefahr der Longitudinaldiffusion und somit die Verwischung der Zonen mehr gegeben ist. Bei einer Strömungsgeschwindigkeit von C kann es sogar durch diese Longitudinaldiffusion entlang der Säulenachse zu einer Einebnung aller Fronten kommen. Eine zu hohe oder / und zu ungleichmäßige Strömungsgeschwindigkeit erhöht auch die Gefahr der Kanalbildung und die Randgängigkeit und kann somit das

Gelingen des Versuches in Frage stellen.
Somit ist für jede Austauscherpackung (Saulengröße, Schlankheitsgrad und Partikelgröße des Austauschers sowie ihre Kapazität) die günstigste Strömungsgeschwindigkeit herauszufinden. Diese ist in bestimmten Bereichen variabel und darf die untere bzw. die obere Grenze nicht unter- bzw. überschreiten. Daß diese eingestellte Geschwindigkeit während der gesamten Versuchsdauer konstant bleiben muss, versteht sich von selbst.
Wie schon eingangs erwähnt, ist ein die Geschwindigkeit bestimmender Faktor der verwendete Überdruck. Dieser kann in einfachster Form durch Niveauunterschiede zwischen der Säulenoberfläche und der die Puffer beinhaltenden Gefäße hergestellt werden. Je größer der Niveauunterschied umso größer der Überdruck und damit auch die Strömungsgeschwindigkeit. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, daß es während des Versuches infolge des steigenden Strömungswiderstandes in der Packung, besonders bei zu langen und zu schlanken Säulen zu einer allmählichen Verlangsamung des Flusses kommen kann, die dann eine erneute Höheneinstellung des Puffergefässes erfordert. Der Strömungswiderstand verändert sich während des Versuches nicht nur wegen dem Festerwerden der Packung, sondern besonders wegen der durch Veränderung der Konzentration des Eluens verursachte Quellungsänderung der Packung. Zur Erzielung einer konstanten und bei jedem Versuch einfach und beliebig einzustellenden Flussgeschwindigkeit wurden deswegen verschiedene Apparaturen vorgeschlagen. Heute wird am meisten ein Pumpe verwendet, die je nach der Herstellungsfirma eine verschiedene Konstruktion aufweist. Wir verwendeten bei unseren Untersuchungen eine Vielfach-Schlauchpumpe nach

G r a s s m a n n und H a n n i g .

Der Flüssigkeitstransport erfolgt durch Abrollen einer Anzahl von Walzen, die selbst in einem Kreis angeordnet sind, über einer Anzahl von Schläuchen (Abb. 11). Der Antrieb erfolgt von einem stufenlos regelbaren Getriebemotor über einen Kettenantrieb. Die richtige Umdrehungszahl der Walzen pro Minute sowie der richtige Abdruck der Rolle ist sehr einfach einstellbar.
Die Umdrehungszahl der Walze pro Minute, der Andruck der Rolle auf die Schläuche und der Durchmesser der Schläuche bestimmen die geforderte Flüssigkeitsmenge und sind die Variablen der Pumpe. Es können gleichzeitig mehrere Schläuche verwendet und somit auch mehrere Säulen mit der gleichen Strömungsgeschwindigkeit (soweit die Strömungswiderstände in den verwendeten Säulen gleichgroß sind) versorgt werden. So haben wir gute Erfolge bei Verwendung einer Doppelsäulentechnik erzielen können und zwar sowohl beim Vergleich zweier pathologischer Seren miteinander als auch mit Normalseren. Die Strömungsgeschwindigkeit, ausgedrückt in ml/h betrug bei den meisten unserer Untersuchungen zwischen 15 bis 30 pro Stunde und ist bei den einzelnen Versuchen getrennt angegeben.

3.1.7.

Sammeln der Fraktionen

Wie alle Verfahren eines flüssigen Chromatogramms ist auch die Gradienten-Elutionschromatographie durch ein relativ großes Elutionsvolumen und eine kleine Trennsäule gekennzeichnet. Das Eluat muß in einer Serie von Reagensgläsern gleicher Volumina zur weiteren Untersuchung gesammelt werden. Dies kann mit der Hand geschehen, erfordert jedoch viel Zeit und Personalaufwand. Es wurden deswegen sehr frühzeitig automatische Fraktionssammler entwickelt und in den Handel gebracht. Die einzelnen Fraktionen können bei verschiedenen Fraktionskollektoren je nach der Fragestellung, sowohl nach Zeit als auch nach Tropfenzahl, Gewicht und Volumina gesammelt werden.

Zeitgesteuerte Fraktionskollektoren:

Ist die Durchflussrate bei einer chromatographischen Untersuchung konstant, dann können die Fraktionen mittels eines zeitgesteuerten Fraktionskollektors abgefangen werden. Ein elektrisches Uhrwerk gibt jede Minute einen Impuls auf einen Sammler (Telephonrelais), nach einer eingestellten Zeit schiebt sich der Fraktionskollektor weiter und das Relais kehrt in seine O-Lage wieder zurück. Die von S c h r o e d e r und C o r e y (199) angegebene Ausführungsform benützt als treibende Kraft ein sinkendes Gewicht.

Die zeitgesteuerten Fraktionskollektoren besitzen eine einfache Konstruktion und arbeiten zuverlässiger als die nach Volumen bzw. tropfengesteuerten Sammler. Sie haben den Vorteil, daß man ohne weiteres mehrere Trennsäulen über der Drehscheibe anbringen, eluieren und fraktionieren kann. Sie sind außerdem nicht so kostspielig wie andere Ausführungsformen. Über die zeitgesteuerten Fraktionskollektoeren siehe auch (3o,95,199,23o).

Volumengesteuerter Fraktionskollektor:

Wenn aber die Fraktionen exakt nach dem Volumen gesammelt werden sollen und die Fließgeschwindigkeit nicht stabilisiert werden kann, dann müssen volumengesteuerte Fraktionskollektoren verwendet werden, die je nach Bauart verschieden sein können (19,44,57,58,84.86.1o9,133). Bei Siphonbetrieb wird z.B. zwischen Säule und Kontaktgeber ein Soxlet von gewünschtem Volumen so angebracht, daß während dessen selbsttätiger Entleerung ein Impuls weitergegeben wird, der nach einiger Verzögerung das Fortschalten der Drehscheibe bewirkt.

Tropfengesteuerter Fraktionskollektor:

Häufig ist es bei analytischen Untersuchungen notwendig, kleine Fraktionen, die ein Volumen von weniger als 1 bzw. 2 ml haben, zu sammeln. In diesen Fällen eignet sich am besten eine tropfengesteuerte Apparatur. Ist das spezifische Gewicht des einzelnen Tropfens gleich, dann haben alle Fraktionen das gleiche Volumen. Die Anzahl der abfallenden Tropfen wird bei den meisten dieser Apparaturen in der Weise bestimmt, daß ein unter der Säule angebrachter Lichtstrahl,der auf eine Photozelle fällt, durch jeden Tropfen unterbrochen wird. Die so gewonnenen Impulse werden durch einen Impulszähler gesammelt und nachdem die eingestellte Zahl von Tropfen gesammelt ist, dreht sich der Fraktionskollektor um ein Reagensglas weiter und das Zählgerät und alle Schaltelemente werden dann wieder in die Ausgangsstellung gebracht (21,43,97,218).

Gewichtsgesteuerter Fraktionskollektor:

In der einfachsten Form eines gewichtsgesteuerten Fraktionssammlers schwimmt die Drehscheibe mit den Reagensgläsern in einem Becken; wenn das Reagensglas durch das in ihm gesammelte

Eluat ein bestimmtes Gewicht erreicht hat, rutscht es unter eine Schranke und gibt den Weg zum nächsten Glas frei (157). Über diesen Typ von Fraktionskollektor siehe auch bei (15,186, 206).

Spezieller Fraktionskollektor:

Es ist auch ein spezieller Fraktionskollektor zu Fraktionierung von radioaktiven Lösungen entwickelt worden (131).

Die einzelnen Fraktionen werden hierbei gewechselt, wenn

1. die Aktivität vom Effluent ein Minimum erreicht (eine neue Komponente erscheint)
2. die Aktivität unter einen vorbestimmten Wert fällt und
3. das Reagensglas voll wird.

Wir arbeiteten mit einem Fraktionskollektor, der sowohl eine Zeitsteuerung als auch Tropfen- und Volumensteuerung erlaubte. Es wurde jedoch fast ausschließlich die Zeitschaltung benützt. Das gesammelte Volumen pro Fraktion wird bei den einzelnen Untersuchungen getrennt angegeben.

Alle diese beschriebenen Geräte außer jene für radioaktive Lösungen haben den Nachteil, daß sie unabhängig vom Auftreten einer Zone stets eine Eluatfraktionierung nach der einmal eingestellten Einheit vornehmen. Interessant wäre jedoch das Sammeln austretender Zonen.

3.1.8 Doppelsäulen-Technik

Zum Vergleich zweier pathologischer bzw. eines normalen und eines pathologischen Serumchromatogramms, war es notwendig 2 Säulen unter vollkommen gleichen Bedingungen gleichzeitig zu eluieren. Dies war mit folgender Versuchsanordnung möglich: 2 Säulen gleicher Dimensionen werden gleichmässig gegossen und mit dem Anfangspuffer equilibriert. Der zur Elution notwendige Puffer wird ständig mittels eines Schlauches von einer Gradienten-Mischbatterie entnommen und dann mittels eines 2-Wegehahnes in 2 Schläuche verteilt. Die Schläuche werden unter Zwischenschaltung der früher erwähnten Pumpe an die beiden Säulen angeschlossen. Die Pumpe gewährleistet völlig gleiche Durchflussgeschwindigkeit in beiden Schläuchen. Da der Strömungswiderstand in beiden Säulen gleich ist, wird die Durchflussrate bzw. die Elutionsgeschwindigkeit auch in beiden Säulen gleich sein. Die mittels dieses Verfahrens gewonnenen Chromatogramme sind, wenn die Analysenlösungen im Hinblick auf ihr Volumen und ihre Zusammensetzung gleich sind, völlig miteinander identisch.

3.2. Nachweis, Charakterisierung und Identifizierung der Fraktionen

3.2.1 Allgemeines

Nach erfolgter Trennung der auf die Säule aufgesetzten Analysenlösung z.B. die Serumprobe, müssen die einzelnen Zonen identifiziert und charakterisiert werden. Dies kann teils schon an der Säule und teils im Eluat geschehen. Zum Nachweis, Charakterisierung und Identifizierung der einzelnen gewonnenen Fraktionen werden sowohl physikalische als auch chemische, immunchemische und physikochemische Methoden verwandt. Bei der Untersuchung der Eiweißkomponenten kommen hauptsächlich folgende Methoden in Frage:

Messung der optischen Dichte der einzelnen Fraktionen,
Gesamteiweißbestimmung " " " ,
Elektrophorese " " " ,
Immunelektrophorese " " " ,
Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony,
modifizierte Immunelektrophorese nach Ossermann,
Ultrazentrifuge,
Aminosäurenanalyse,
Messung der Radioaktivität bei radioaktiv-markierten Substanzen,
Messung der positiven oder negativen Reaktionswärme am unteren Ende der Chromatographiesäulen.

Die von uns verwandten Methoden werden hier genauer beschrieben. Ganz allgemein ist zu sagen, daß es eine für alle chromatographischen Versuche einzusetzende Methode nicht gibt. Maßgebend ist immer die Fragestellung bzw. nach welchen Prinzipien man die einzelnen Zonen identifizieren will.

3.2.2 Nachweis der Farbkomponenten an der Säule

Durch die Eigenfarbe verschiedener Proteine und ihre unterschiedliche Affinität zum Ionenaustauscher erscheinen an der Säule, nachdem die Eiweißprobe in diese eingesickert ist, verschiedene Farbzonen. Albumin hat z.B. einen gelben, Transferrin einen roten und Coeruloplasmin einen blauen Farbton. Siehe auch Seite 110.

3.2.3. Messung der optischen Dichte

Als Maß der Eiweißkonzentration wurde die optische Dichte - das ist die Änderung des Durchsichtigkeitsgrades bei Passieren einer Komponente durch die Meßküvette - in den einzelnen Fraktionsröhrchen mittels eines Spektralphotometers+ bei 280mμ gemessen. Die graphische Darstellung des Konzentrationsgradienten erfolgte dann durch Aufzeichnen der ermittelten Extinktionswerte als Ordinate und die Anzahl der Röhrchen als Abszisse auf Millimeterpapier. Das so gewonnene Chromatogramm veranschaulicht gut den Trennvorgang und ermittelt das Auftreten der einzelnen Komponenten. Ausserdem wurde zur ständigen Kontrolle der Trennvorgang mittels Uvicord Absorptiometer LKB 4700 durch kontinuierliche Messung bei 253 mμ von einem Schreiber registriert.

Die Höhe der einzelnen "Peaks", die nicht unbedingt symmetrisch sein müssen, bzw. die eingeschlossene Fläche von einem solchen "Peak" ist ein Maß für die Eiweißkonzentration der dazugehörenden

---

+= PMQ II Zeiss Photometer, Hitachi Perkin-Elmer Spektralphotometer UV/VIS Modell 139

Fraktionen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die verschiedenen Proteine nicht dieselben Adsorbtionskoeffizienten besitzen, so z.B. hat das Gamma-Globulin bei derselben Konzentration den doppelten Extinktionswert bei 280mμ als Albumin.
Man kann somit aus dem erhaltenen Chromatogramm, ohne Berücksichtigung der spezifischen Adsorbtionskoeffizienten der einzelnen Proteine keine exakten quantitativen Aussagen über die prozentuale Verteilung der einzelnen Eiweißkörper machen.
Jedoch ist ein quantitativer Vergleich zweier identischer Fraktionen in 2 Chromatogrammen möglich.

3.2.4 Konzentrierung

Nachdem der Eiweissgehalt der einzelnen Fraktionen, ausser derjenigen mit hohen Extinktionswerten, für elektrophoretische, sowie andere Untersuchungen zu gering ist, erscheint eine Konzentrierung der Fraktionen notwendig. Zu diesem Zweck haben wir eine Anzahl der Röhrchen in Abhängigkeit ihrer Lage in dem Chromatogramm zusammengenommen und dann auf das gewünschte Volumen, meist 1-2 ccm, eingeengt. Die Röhrchen, die den Höhepunkt der einzelnen chromatographischen Zacken darstellten, blieben unvermischt und wurden einzeln eingeengt oder uneingeengt untersucht. Zur Konzentrierung verwendeten wir Carbowax[+1], ein Polyäthylenglykoll mit dem Molekulargewicht 20 000. Dieses wurde in Zellophan-Dialysierschläuche[+2] von 18-20 mm Durchmesser gefüllt und in das Eluat eingetaucht. Die Menge des eingefüllten

---

[+1] = Farbwerke Höchst

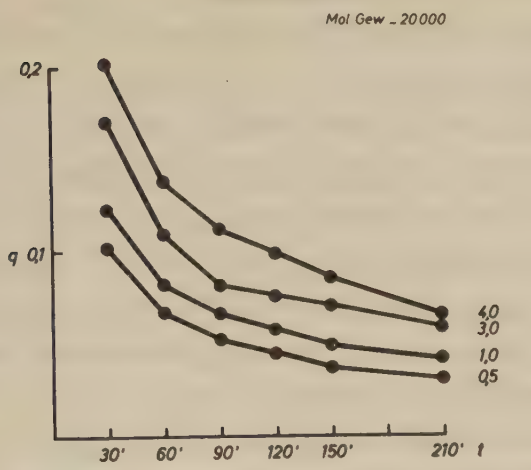
[+2] = Fa. Kalle & Co. Wiesbaden-Biebrich

Carbowaxes ist abhängig von dem Volumen der einzuengenden eiweißhaltigen Lösung und betrug bei unseren Versuchsbedingungen meist zwischen 1-3 g Carbowax. Die Eintauchtiefe des mit Carbowax gefüllten Dialysierschlauches richtete sich nach dem erwünschten Konzentratvolumen. Als Einengungsgefäße benutzten wir meistens Reagensgläser.

Durch eine Anzahl von Vorversuchen haben wir festgestellt, daß:

1. die Konzentrationsgeschwindigkeit in den ersten 30 Minuten am größten ist und mit der Zeit abnimmt,
2. die Konzentrationsgeschwindigkeit bis zu einer Grenze abhängig ist von der Menge des verwendeten Carbowaxes,
3. die effektive Oberfläche des Carbowaxes, die der einzuengenden Lösung zur Verfügung steht, einen großen Einfluß auf die Einengungsgeschwindigkeit hat,
4. bei richtig durchgeführter Technik keine bzw. eine zu vernachlässigenden Eiweißmenge verloren geht,
5. bei Verwendung von normalen Reagensgläsern (160 x 16 mm) die Verwendung von mehr als 3 g Carbowax nicht mehr zweckmäßig ist,
6. 1-2 g Carbowax vollkommen zur Einengung von 15 ccm eiweißhaltiger Lösung über Nacht bei 4°C ausreicht.

An dieser Stelle seien 2 unserer Diagramme zur Veranschaulichung der Vorgänge wiedergegeben (Abb.10). Durch dieses Verfahren war es also möglich, mehrere Fraktionen zu gleicher Zeit und unter geringstem Arbeits- und Zeitaufwand bei 4°C zu konzentrieren.



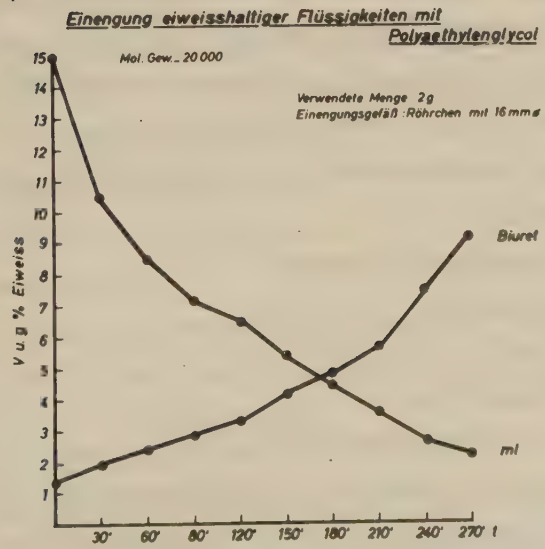


Abbildung 10

Einengung von eiweißhaltigen Flüssigkeiten mit Polyaethylenglycol.
a) Konzentrationsgeschwindigkeit als Funktion der Zeit.
b) Volumenabnahme und Gesamteiweißzunahme während der Einengung in abhängigkeit der Zeit.

3.2.5 Papierelektrophorese

Die Papierelektrophorese-Untersuchung wurde nach dem Standardverfahren von G r a s s m a n n und H a n n i g (77) durchgeführt. Für die elektrophoretische Trennung wird eine Kammer im Ausmass von 38,5 x 54,5 cm aus Kunststoff verwendet, die für 1 Brücke im Ausmaß von 32,5 x 22,8 cm Platz gibt. Jede Brücke gestattet somit die Auflage von 2 Filterpapierstreifen+ von je 28,6 x 14 cm. Die effektive Trennlänge beträgt 13 cm. Bei der Auftragung der zu untersuchenden Eiweißlösungen ließ man rechts und links auf dem Papierstreifen je 2 cm frei. Der dazwischenliegende Raum wurde in 4 x 2,5 cm eingeteilt. Auf der ersten Teilstrecke wurde das Ausgangsserum und in den weiteren drei Teilstrecken drei verschiedene chromatographische Fraktionen aufgetragen. Die Menge der aufzutragenden Proteinlösung richtete sich nach ihrer Konzentration. Als Puffer verwendeten wir Veronal-Natriumacetat-Puffer nach M i c h a e l i s (141), vom pH 8,6 und einer Ionenstärke U= 0,1, folgender Zusammensetzung:

58,86 g Na-diäthylbarbituricum
38,86 g Na-Acetat,
360 ml n/10 HCL
ad 6000 ml Aqua dest.

Die Trennzeit betrug 14 Stunden bei einer Spannung von 120 Volt. Gefärbt werden die Streifen in einer gesättigten Amidoschwarz-Lösung (5 g Amidoschwarz + 100 ml Eisessig + 900 ml Methanol). Mit einer Mischung von Eisessig und Methanol im Verhältnis 1:10 werden sodann die Streifen entfärbt.

+= Whatman Nr. I

Durch dieses Verfahren war es möglich die verschiedenen Eiweißlösungen unter völlig gleichen Bedingungen elektrophoretisch zu untersuchen, die Mobilität der einzelnen Komponenten der chromatographischen Fraktionen untereinander zu vergleichen und mit den elektrophoretischen Komponenten des Ausgangsserums zu identifizieren. Die elektrophoretische Untersuchung wurde routinemässig bei allen Fraktionen durchgeführt. Über die weitere Ausführung der elektrophoretischen Untersuchungen siehe bei G r a s s m a n n und H a n n i g (77), G r a s s m a n n , H a n n i g und K n e d e l (76), sowie bei K n e d e l (116).

3.2.6 Immunoelektrophorese

Die Immunoelektrophorese wurde nach der Methode von G r a b a r und W i l l i a m s (74) in der Mikromodifikation von S c h e i d e g g e r (192) durchgeführt.

A. Herstellung des Stammpuffers:

58,84 g Natrium-diäthylbarbiturat

38,84 g Natriumacetat

werden mit Aqua dest. auf 2000 ml aufgefüllt. Zu dieser Lösung wird dann 2400 ml Aqua dest. zugegeben und mit etwa 700 ml 0,1 n HCl auf pH 8,2 eingestellt.

Herstellung des Agars:

4 g Reinagar+ werden mit einer Mischung von 1 Teil Stammpuffer und 2 Teilen Aqua dest. etwa 45 Minuten im Dampftopf gelöst und so ein 2% Agar hergestellt. Zur Entfernung der feinen Staubteilchen wird der heisse Agar 2 - 3 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert und Cialit als Konservierungsmittel zugesetzt.

+ = Behringwerke AG, Marburg/Lahn

Dann füllt man den so hergestellten Agar in Reagensröhrchen ab, die man, wenn man nicht die ganze Menge verbraucht, im Eisschrank bei 4°C aufbewahren kann. Zum Gebrauch wird dann diese Lösung im siedenden Wasserbad flüssig gemacht und mit einer stumpfen 10 ml-Pipette jeweils 2,2 ml Agar auf die vorbereiteten Objektträger gegossen. Die Objektträger müssen vollkommen fettfrei sein und auf einer waagerechten Unterlage liegen.
Die so vorbereiteten Objektträger müssen 15 Minuten vor Beginn eines Ansatzes in einer feuchten Kammer liegen, damit der Agar fest werden kann, ohne auszutrocknen.

C. Herstellung des Gebrauchspuffers zur Kammerfüllung:
Zum Füllen der Immunoelektrophoresekammer, die im Prinzip der normalen Elektrophoresekammer entspricht, wurden zu 2 Teilen Stammpuffer 1 Teil Aqua dest. zugegeben.

D. Ausstanzen der Antigenlöcher sowie der Antigenrille:
Die nach obiger Vorschrift vorbereiteten Plättchen werden dann nach Erstarren des Agars mit zwei Löchern sowie einer Rille zum Auftragen des Antiserums mittels eines Stanzapparates versehen.

E. Durchführung der Methode:
Die vorgestanzten Antigenlöcher werden mit einer Saugnadel (abgeschliffene, stumpfe Transfusionsnadel, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist) herausgesaugt.
Die zu untersuchende Proteinlösung (Antigen) wurde mit einer fein ausgezogenen Mikropipette in die Antigenlöcher eingefüllt (etwa 0,001 ml). Die 10 so beschickten Agarplättchen werden dann auf die Brücke gelegt und in die Kammer gestellt. Der Kontakt mit dem Puffer wurd durch angefeuchtete Filterpapierstreifen,

die auf beiden Seiten fest auf der Agarschicht aufliegen, hergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung war nach 90 Minuten bei einer Stromstarke von 45 mA/sec und einer Spannung von 280 V beendet. Anschließend wurde die vorgestanzte Antikörperrille ausgehoben und mit einer Pipette mit etwa 0,06 - 0,08 ml Antiserum gefüllt. Die Plättchen wurden danach zur Entwicklung der Immunpräzipitationslinien in eine feuchte Kammer gebracht. Nach 12-16 Stunden waren die Präzipitationslinien optimal ausgebildet und konnten anschließend zur Entfernung der nicht präzipitierten Proteine mit Kochsalz gewaschen werden.

F. Methode zur Dokumentation der erhobenen Befunde:

Die Immunoplättchen wurden entweder vor oder nach der Färbung fotografiert. Zum Fotografieren der Präzipitationslinien vor der Färbung, wurden die Objektträger kurz mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und in eine schlieren- und luftblasenfreie Petrischale gelegt und mit Kochsalz überschichtet. Die Petrischale wurde in den Zwischenraum des Vergrößerungsapparates eingeschoben.

G. Färbung:

Zur Färbung der Plättchen wurde A z o k a r m i n G verwandt.

Herstellung der Azokarminlösung:

2 g Azokarmin G + 50 ml Eisessig + 450 ml Methanol. Diese Mischung wurd durch ein hartes Filter filtriert.

Entfärber: 10% Essigsäure

Die Agarplättchen werden nach beendeter Diffusion für 1 - 2 Tage mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, dann mit Filterpapier bedeckt und an der Luft oder mit einem Föhn getrocknet. Anschliessend wird der Papierstreifen entfernt. Die zurückgebliebenen Papierreste werden unter fließendem Wasser vorsichtig

abgewaschen. Danach kommen die Plättchen 15 Minuten in Azokarmin und werden anschließend in mehreren Entfärbebädern entfärbt.

Die Säulenfraktionen wurden zunächst gegen Anti-Human-Serum vom Kaninchen angesetzt. Zur weiteren Differenzierung sowie Charakterisierung der Fraktionen verwendeten wir gezielt andere spezifische Antiseren. Wie oben schon beschrieben, wurde immer auf demselben Objektträger das Ausgangsserum und eine chromatographische Fraktion gleichzeitig untersucht. Dadurch war die einwandfreie Identifizierung der in der zu untersuchenden Fraktion vorkommenden Komponente mit dem Ausgangsserum möglich. Bei der immunelektrophoretischen Analyse verwendeten wir folgende Immunseren:

Anti-Human-Kaninchenserum
" " -Albumin-Kaninchenserum
" " -Immunglobulinserum von der Ziege
" " -α_2M-Kaninchenserum
" " -Transferrin-Kaninchenserum
" " -Pferdeserum
" " -γ_M-Serum vom Pferd
" " -γ_A-Serum von der Ziege
" " -γ_G-Serum vom Kaninchen
" " -β_{1A}/β_{1C}-Serum vom Kaninchen
" " -α_2-Haptoglobin-Serum vom Kaninchen

Die Sereren stammen teils von der Fa. Behring und teils von der Fa. Hyland/Travenol.

3.2.7 Zweidimensionale Agardiffusionsmethode nach Ouchterlony

A. Prinzip der Methode:

Auf einer Agarplatte werden in einer bestimmten Anordnung verschiedene Antigenlöcher und ein Antikörperreservoir ausgestanzt. Diese werden mit Antigen bzw. Antiserum gefüllt.
Nach einer entsprechenden Diffusionszeit bilden sich dort, wo ein Antigen mit dem ihm entsprechenden Antikörper zusammentrifft, isolierte Präzipitationslinien.
Diese Präzipitationslinien sind je nach der Diffusionsgeschwindigkeit und Konzentration der ihr zugrundeliegenden Antigene verschieden weit von der Auftragsstelle lokalisiert.
Die Diffusionsgeschwindigkeit wird hauptsächlich von der Molekülgröße bestimmt.
Wenn zwei Antigene zweier benachbarter Löcher miteinander identisch sind, dann gehen die gebildeten Präzipitationslinien ohne Spornbildung ineinander über; haben jedoch die beiden Antigene nur teilidentische Antigendeterminanten, ohne miteinander völlig identisch zu sein, dann gehen die beiden gebildeten Präzipitationslinien nur unter Bildung einer sogenannten "einfachen" Spornbildung ineinander über. Der Übergang ist also gegabelt.
Bei völliger Verschiedenheit der Antigene würden die beiden Präzipitationslinien sich kreuzen (zweifache Spornbildung).

B. Durchführung der Methode:

Agarherstellung:

15 g Difco-Bacto-Agar werden mit 1000 ml Aqua dest. versetzt und 4 - 5 Stunden quellen gelassen. Anschließend gibt man 100mg Cialit zu. Der Agar wird sodann im Wasserbad so lange erwärmt, bis er dünnflüssig, klar und homogen geworden ist. Er wird in Reagensgläsern bei 2 - 4°C aufbewahrt.

Die vorgereinigten Glasplatten (8,5 mal 10cm) oder auch Objektträger werden mit 1,2 bis 2,2 ml des Agars gleichmäßig begossen. Nach Erkalten des Agars werden die Löcher nach der Anordnung, die in Abbildung 14a wiedergegeben ist oder in Rosettenform ausgestanzt. Die Antigene (die zu untersuchende Proteinlösung) und die Antisera werden in die entsprechenden Löcher eingefüllt. Die Diffusion erfolgt dann anschließend in einer feuchten Kammer. Die Diffusionszeit ist von dem verwendeten Muster (Abstand der Löcher sowie Lochgröße) abhängig und beträgt zwischen 12-48 Stunden.
Nach optimaler Ausbildung der Präzipitationslinien werden die Platten mit physiologischer Kochsalzlösung für die Dauer von 12-24 Stunden gewaschen. Danach wie bei der Immunoelektrophorese getrocknet, gefärbt und fotografiert.
Die Agarplatten können auch ungefärbt fotografiert werden, indem man sie direkt auf das Fotopapier legt.

3.2.8 Modifizierte Immunoelektrophorese nach Ossermann

Bei dieser nach Ossermann (149) modifizierten Immunoelektrophorese werden nach der elektrophoretischen Auftrennung des zu untersuchenden Serums zwei Rillen parallel zur Wanderungsrichtung ausgehoben - jeweils ober- und unterhalb des Antigenloches. Die obere Rille wird mit Antiserum, die untere Rille mit der zu untersuchenden Fraktion gefüllt. Danach werden die Plättchen in einer feuchten Kammer für 24-48 Stunden der Diffusion unterworfen.
Es kommt dabei zur Ausbildung einer horizontalen Präzipitationslinie zwischen dem Antiserum und der Diffusionsfront der

zu untersuchenden Fraktion.
Diese Präzipitationslinie besitzt eine charakteristische Ausbuchtung an der Reaktionsstelle des Antiserums mit der Komponente des Serums, die der zu untersuchenden Säulenfraktion entspricht.

3.2.9 Sedimentationsanalytische Untersuchung mittels Ultrazentrifuge

Die Ultrazentrifugen-Untersuchungen wurden mittels einer analytischen Ultrazentrifuge Spinco Modell E bei 59780 UpM durchgeführt. Die chromatographischen Fraktionen wurden vor der Untersuchung mehr als 48 Stunden gegen physiologische Kochsalzlösung bei 4°C dialysiert. Die Eiweißkonzentration der von uns untersuchten Proteinlösungen betrug 1%. Der Sedimentationskoeffizient bezieht sich auf $S_{20}W$. Der Phasenwinkel lag zwischen 60 und 80 Grad. Die erste photographische Aufnahme wurde unter Beobachtung der Sedimentation von Hand gemacht. Die weiteren Aufnahmen wurden automatisch ausgelöst.

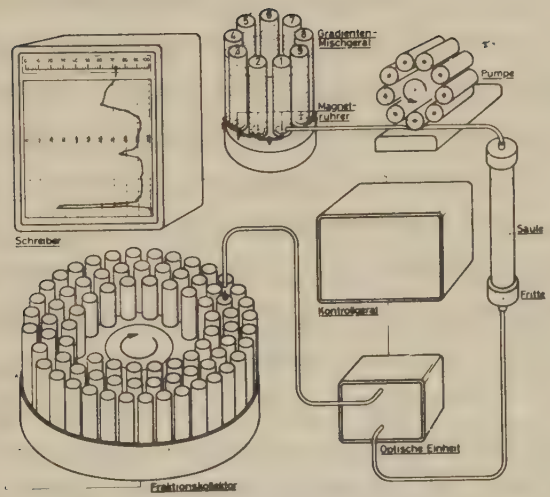
3.2.10 Präparative Elektrophorese mit Kartonpapier als Trägermaterial

Zur Isolierung und Reindarstellung der Proteinfraktionen ist meist ein Verfahren nicht ausreichend. Deshalb ist zur Isolierung einheitlicher Fraktionen eine Kombination verschiedener Methoden besonders erfolgversprechend, da dann verschiedene Eigenschaften der Proteine zu ihrer Reindarstellung benützt werden. Wir haben häufig besonders diejenigen Fraktionen, die durch alleinige Säulenchromatographie nicht rein zu erhalten waren, erst mittels eines präparativen Elektrophoreseverfahrens

vorgereinigt und dann säulenchromatographisch isoliert, oder umgekehrt.

Zu dieser elektrophoretischen Vorfraktionierung verwendeten wir das von K n e d e l und S p e r l (121) angegebene präparative Elektrophorese-Verfahren. Für die Trennung benützten wir eine Trennkammer im Ausmaß von 66 x 45 cm aus Kunststoff, die zur Aufnahme von 3 Brücken im Ausmaß von 22 x 21 cm Platz bot. Als Trägermaterial wurde das Kartonpapier 866 MN im Ausmaß von 30 x 15 cm und als Puffer der 1 : 1 verdünnte Veronal-Natrium-Puffer nach M i c h a e l i s (141) benützt. Aufgetragen wurden auf jeden Streifen 2,4 ccm Serum. Die Trennzeit betrug 14 - 16 Stunden bei einer Spannung von 6 - 12 Volt/cm Kartonstreifen. Zur Lokalisierung der Zonen benützten wir das Abklatsch-Verfahren nach C o n s d e n und Mitarbeitern. Anschließend wurden die Zonen auf dem Karton unter Zuhilfenahme der gefärbten Abklatsche lokalisiert und die einzelnen Fraktionen herausgeschnitten. Die Eiweißfraktionen wurden dann mittels einer Preßapparatur eluiert. Vor der chromatographischen Untersuchung wurden die so gewonnenen Fraktionen mittels auf Seite 10 beschriebener Methode eingeengt. Die Einzelheiten dieser präparativen Kartonelektrophorese sind aus der Originalarbeit (186) zu entnehmen.

Am Ende dieses Kapitels sei noch eine schematische Darstellung der von uns verwendeten apparativen Einrichtung wiedergegeben. (Abb.11)



Schema einer Anordnung für die Säulenchromatographie

Abbildung 11

Schema einer Anordnung für die Säulenchromatographie.

4. Untersuchungsgut

Mit der Methodik der kontinuierlichen Gradientenelutionschromatographie an DEAE-Cellulosen oder/und DEAE-Sephadexsäulen wurden 117 Seren untersucht. Zum Vergleich zweier pathologischer bzw. eines normalen und eines pathologischen oder zweier Normalseren verwandten wir die Doppelsäulentechnik. Unter den 117 Seren befanden sich 3o Normalseren, 35 Seren von Fällen mit γ-G, 2o mit γ-A, 14 mit γ-M, einer mit Doppelparaproteinämie (γ-G + γ-A) und 6 Fälle mit Doppelalbuminämie (aus 2 Sippen), 2 Fälle mit sogenanntem α_2-Plasmocytom vom γ-G-Typ und 9 Fälle mit Dysproteinämien verschiedener Genese. Die Seren stammten bei γ-G, γA und Doppelparaproteinämien von Patienten bei denen die Diagnose Plasmocytom klinisch, röntgenologisch, klinisch-chemisch sowie histologisch gesichert worden war. Bei γ-M-Paraproteinämien handelte es sich um Patienten mit gesichertem Morbus Waldenström. Die Personen mit Doppelalbuminämie zeigten kein Krankheitsbild.

Ergebnisse

.1. Normalseren

o Normalseren wurden mit der beschriebenen Methode chromato=
raphisch untersucht und die Eiweißkonzentrationsgradienten
raphisch dargestellt.Als Ionenaustauscher wurde DEAE-Cellulose
nd DEAE-Sephadex verwendet.Die Verteilung der chromatographi=
chen Peaks war bei allen Normalfällen praktisch die gleiche.
ie Chromatogramme unterschieden sich untereinander lediglich
n der Größe der einzelnen Zacken.Diese Unterschiede sind auf die
ormale Schwankungsbreite der einzelnen Serumkomponenten der
erschiedenen Seren zurückzuführen.Wie schon beschrieben wurde
as Serum,ehe es auf die Säule aufgetragen wurde,für die Dauer
on mehr als 8 Stunden gegen den zu Anfang der Elution zu ver=
endenden Puffer bei 4 Grad C unter ständigem Rühren dialysiert
nd sodann zentrifugiert.Der klare bernsteinfarbene Überstand
urde auf die Säule gegeben und das Präzipitat nach der analy=
ischen Untersuchung verworfen.Der Eiweißgehalt des letzteren
etrug zwischen o,5 bis 2,o g% von dem gesamten Serumprotein
es Ausgangsserums.Dies stimmte mit den Angaben in der Literatur
berein($\frac{154}{21o}$).Die elektrophoretische Untersuchung des Präzi=
itates ergab,daß dieses hauptsächlich aus Gammaglobulinen,
ber auch aus Albuminen,Alpha$_1$-α_2 und ß bestand.Folgendes Bei=
piel sei hier noch erwähnt:Elektrophorese des Ausgangsserums
Pat.Fa.) vor der Dialyse :Alb.55,2 rel.%,$\alpha_1$5,8 rel.%,$\alpha_2$7,o rel%,
9,3 rel.%,γ 22,7 rel.%.-Elektrophorese des Sediments :Alb.
3,o rel.%,α_1 4,o rel.%,α_2 6,o rel.%,ß 17,o rel.%,γ 45 rel.%.

Nachdem die Serumprobe eingesickert und die Säule an das Elu=tionssystem angeschlossen war,erschienen allmählich an der Säu=le verschiedene diffuse,ineinanderfließende Farbbänder,die sich sodann in scharfen Zonen ordneten.Ihr Auftreten ist auf die unterschiedliche Affinität der Eiweißfraktionen zu dem Ad=sorbent oder,genauer ausgedrückt,auf den Trennfaktor der ihnen zugehörigen Proteine zurückzuführen.Diese Farbbänder bewegten sich im Laufe des Elutionsvorganges mit unterschiedlicher Ge=schwindigkeit nach unten.In der Reihenfolge von oben nach un=ten waren folgende Farben am besten zu erkennen : blau,gelb, braunrot,rot.

Das blaue Band tritt zuletzt auf,bleibt dank seiner hohen Affi=nität zur DEAE-Cellulose besonders aber zu DEAE-Sephadex am längsten an der Säulenspitze und bewegt sich erst bei höchster Elutionskraft nach unten.Man kann es bis zur Mitte der Säule hin verfolgen.Nach genügender Konzentrierung des Eluats des letzten chromatographischen Peaks hat dies eine blaue Farbe.Es enthält ein Protein mit elektrophoretischer α_2-Mobilität. Spektralphotometrisch hat es zwei Maxima : eines bei 28o m und eines bei 6o2 m .Immunelektrophoretisch wurde es als Coeru=loplasmin identifiziert.Der letzte chromatographische Peak enthält etwa 3o% von diesem Eiweiß.

Die rote Farbe erscheint am frühesten;wandert verhältensmäßig rasch nach unten und ist etwa bis 2/3 der Säulenlänge erkennbar. Diese farbige Proteinkomponente entspricht elektrophoretisch einem β_1-Globulin.Seine Identifizierung als β_1-eisenbindendes Protein bzw.Transferrin gelang uns mittels Immunelektrophorese. Es hat zwei Maxima :bei 28o m und bei 46o m .Die zweite chro=matographische Zacke enthält über 9o% dieser Fraktion.

Der braunrote Farbring ist nur für kurze Zeit sichtbar, entspricht nach den Angaben der Literatur (154, 21o) dem Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex und hat spektralphotometrisch 2 Adsorptionsmaxima: bei 28o mμ und bei 46o mμ .
Die gelbe Farbzone ist am breitesten und wandert mit einer Geschwindigkeit, die langsamer ist als die der roten Komponente und verbreitert sich nach und nach im Verlauf des Elutionsvorganges. Die dritte große und breite chromatographische Zacke enthält diese gelbliche Komponente. In den eingeengten Elutionsfraktionen des dritten chromatographischen Peaks, in denen die gelbe Farbe immer zu erkennen ist, sind hauptsächlich Albumine und α_1-Globuline enthalten.

Abbildung 12 zeigt das Chromatogramm eines Normalserums nach Gradientenelutionschromatographie bei Verwendung von DEAE-Cellulose. Es wurde ein Puffergradient mit abfallendem pH und ansteigender Molarität verwendet, der mittels eines 2-Kolbensystems gewonnen wurde. Dieses Chromatogramm stellt für ein Normalserum eine Standardkurve dar. An diesem Chromatogramm imponieren vor allem 3 große Peaks.
Im ersten scharfen und symetrischen Peak (Fraktion 7-14 in Abb.12) ist der Hauptteil des γ_G-Globulins enthalten, der seinerseits den Hauptteil der im Serum vorkommenden Antikörper enthält. Die 7S - bzw. die γ_G-Globuline mit ihrem isoelektrischen Punkt bei 6,8 - 7,3 werden bei der angegebenen Versuchsanordnung (Anfangspuffer o,o1 Mol Phosphat- oder Tris-HCl pH 8,o) nicht an der DEAE-Cellulose oder an DEAE-Sephadex adsorbiert und

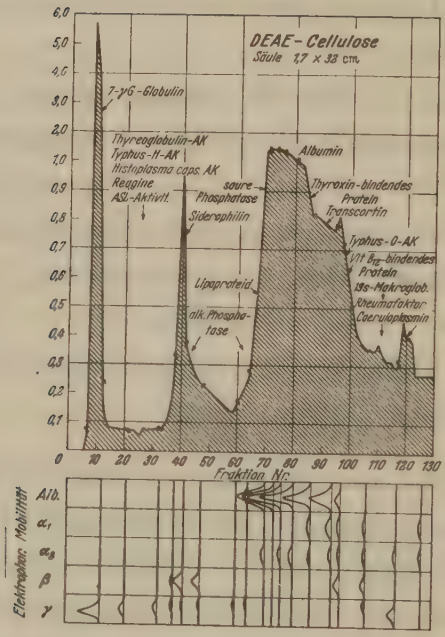


Abbildung 12

Säulenchromatographische Trennung eines Normalserums.

nd laufen mit der Elutionsmittelfront die Säule durch und rscheinen als erste Proteinfraktion im Eluat.Dieses γ_G-Glo= ulin erwies sich sowohl elektrophoretisch als auch in der ltrazentrifuge sowie immunelektrophoretisch als einheitlich Abb.13,14 c).Würde man die Elutionsfraktionen im Bereich der rsten chromatographischen Zacke einzeln elektrophoretisch oder/ nd immunelektrophoretisch untersuchen,dann zeigte sich,daß iese nacheinander folgenden Fraktionen eine unterschiedliche obilität besitzen - ein Hinweis auf Heterogenität im Bereich er γ_G-Globuline. Aus Abb.13 ist zu entnehmen,daß die nachfol= enden Fraktionen eine höhere elektrophoretische Mobilität esitzen als die vorausgehenden.Wenn man die Elutionsfraktionen 5-25 und 26-35(Zwischenzone der 1. und 2. Zacke) zusammengießt nd auf 1 ml einengt,dann zeigt sich,daß auch in diesen Fraktio= en γ_G-Globuline enthalten sind,die eine bedeutend größere elek= rophoretische Mobilität besitzen als der Hauptanteil der γ-Glo= uline im ersten chromatographischen Peak.Immunologisch sind lle diese γ_G-Fraktionen sowohl miteinander als auch mit dem $_G$-Anteil des Ausgangsserums völlig identisch wie wir mittels uchterlony-Test und der modifizierten Immunelektrophorese nach ssermann nachweisen konnten.

ie 2. chromatographische Zacke(Elutionsfraktion 38-42 in Abb.12), ie immer sehr scharf und symetrisch ist,enthält hauptsächlich über 9o%) ß-Globuline mit einer geringen Beimengung von γ-Glo= ulinen.Wie schon erwähnt,besitzen diese Fraktionen 2 Absorp= ionsmaxima bei 28o m und 46o m und haben besonders nach Kon= entrierung eine lachsrote Farbe.Dieses ß-Globulin identifizier= en wir als Siderophilin mittels Immunelektrophorese bei Ansatz it spezifischem Anti-Siderophilin-Immunserum vom Kaninchen(Abb.14b).

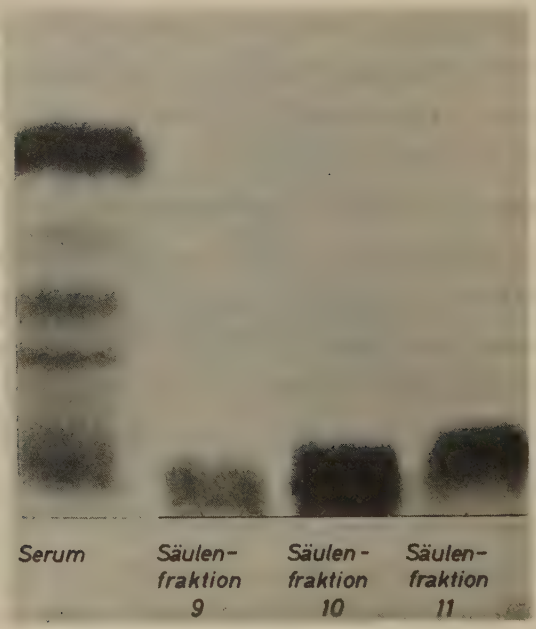


Abbildung 13

Elektrophoretische Untersuchung säulenchromatographisch getrennte
Gammaglobuline.

Abbildung 14

Immunelektrophoretischer Nachweis der säulenchromatographisch getrennten und isolierten Proteine.
a)Albumin.b)Transferrin.c)Gamma-G-Globulin
Antiserum:Antihumanserum vom Kaninchen.

Bei drei der von uns untersuchten Normalseren war die Zacke des Chromatogramms in zwei - eine scharfe symetrische und eine mehr breitere kleinere - Zacken gespalten. Dieser Befund konnte auch bei wiederholten chromatographischen Untersuchungen dieser Seren konstant nachgewiesen werden. Das Siderophilin bildete den Hauptteil an den beiden Gipfeln.

Immunologisch (Immunelektrophorese, Ouchterlony-Test, modifizierte Immunelektrophorese nach Ossermann) verhalten sich die beiden Siderophiline sowohl miteinander als auch mit dem Siderophilin des Augsgangsserum völlig identisch. Ob es sich bei diesen Fällen um das Vorhandensein zweier strukturell unterschiedlicher, immunologisch identischer Siderophiline handelt, kann z.Zt. nicht beantwortet werden.

In der Zwischenzone der 2. und 3. chromatographischen Zacke waren ß- und γ-Globuline nachweisbar und zwar in dem ersten Teil (Elutionsfraktionen 43-47 in Abb.12). Im 2. Teil (Elutionsfraktionen 48-6o in Abb.12) nur γ-Globuline. Das γ-Globulin im zweiten Teil des Chromatogramms hatte eine viel größere elektrophoretische Mobilität als das des ersten Teils. Immunologisch war es jedoch sowohl mit den γ-G-Globulinen des Ausgangsserums als auch mit der γ-Globulinfraktion im ersten chromatographischen Peak identisch.

Der Hauptanteil der 3. großen und breiten chromatographischen Zacke bildete das Albumin, das meist mit anderen kleineren Proteinkomponenten wie α_1 - α_2 - und ß-Globulinen verunreinigt war. Bei Untersuchung der einzelnen Fraktionen (diese wurden von 6 auf 1 ml eingeengt) konnten wir jedoch in manchen Fällen Albumin

sowohl papierelektrophoretisch als auch immunelektrophoretisch rein gewinnen - wie z.B. in den Elutionsfraktionen 7o,71 und 72 in Abbildung 12.Abbildung 15 zeigt die Papierelektrophorese der Fraktionen 7o,71 und 72 im Vergleich mit dem Ausgangsserum und Abbildung 14a zeigt das Immunelektrophoresediagramm des Ausgangsserums(oberhalb der Antikörperrille) und der isolierten Albuminfraktion (unterhalb der Antikörperrille) im Ansatz mit Antihuman-Kaninchenimmunserum.

In dem aufsteigenden Schenkel der 3.Zacke,die immer steil ist, fand sich papierelektrophoretisch α_2 und Albumin.Der α_2-Anteil wurde als α_2-Lipoprotein identifiziert.

Im letzten Teil des Chromatogramms,oft als kleine Zacke darge=stellt,(Fraktion 118-124 in Abb.12) wurde papierelektrophoretisch ein α_2-Globulin nachgewiesen.Dieses hat,wenn man sehr große Men=gen Serum auf die Säule aufträgt oder die Elutionsfraktionen zusammennimmt und stark einengt eine blaue Farbe.Diese farbige Proteinkomponente wurde als Coeruloplasmin identifiziert.α_1,α_2- und ß-Globuline traten im Chromatogramm an verschiedenen ausein=anderliegenden Stellen auf.Dieses Verhalten ist nicht verwunder=lich,da man weiß,daß gerade im elektrophoretischen α- undß-Be=reich die verschiedenartigsten Eiweißkomponenten vorkommen,die sich jeweils nur elektrophoretisch einheitlich verhalten.

Im vorletzten Abschnitt des Chromatogramms (Fraktion 112 -116 in Abb.12) erscheint wieder γ-Globulin,das nur nach starker Ein=engung der Elutionsfraktionen nachweisbar war.Immunologisch handelt es sich um γ-M-Globulin,das besonders bei γ-M-Parapro=teinämien stark erhöht ist(s.Abschnitt γ-M-Paraproteinämie).

Abbildung 15

Elektrophoretische Untersuchung säulenchromatographisch getrennter Albumine.

Unter dem Chromatogramm der Abbildung 12 sind die verschiedenen Proteinfraktionen mit ihren charakteristischen elektrophoretischen Eigenschaften eingezeichnet. Eingezeichnet sind weiterhin in diesem Schema auch viele andere Proteinkomponenten, die bisher mittels Chromatographie an DEAE-Cellulose an verschiednen Teilen des Chromatogramms angereichert, nachgewiesen oder isoliert werden konnten. Diese Angaben wurden teils der Literatur entnommen.

Bei Verwendung verschieden großer Säulen ist festzustellen, daß die Einzelheiten im Chromatogramm besser bei größeren Säulen in Erscheinung treten, obwohl das allgemeine Verteilun smuster der drei Hauptpeaks immer dasselbe ist. Außerdem kann man mit größeren Chromatographieröhren auch größere Mengen von Seren analysieren. Somit eignen sich die größeren Säulen mehr für präparative Zwecke.

Abbildung 16 zeigt zwei Chromatogramme, die mittels der früher beschriebenen Doppelsäul ntechnik erhalten wurden. Da die beiden Chromatogramme die Trennung zweier gleicher Serumproben unter völlig gleichen Bedingungen darstellen, so sind sie auch in ihrer Form miteinander völlig identisch. Somit ist der Beweis erbracht, daß diese Technik ein sehr geeignetes Verfahren zur vergleichenden Untersuchung zweier Analysenlösungen darstellt.

Um den Einfluß des Puffergradienten auf die Elution zu veranschaulichen, haben wir verschiedene Gradienten zur Elution verwendet. Die Gradienten wurden mittels V a r i g r a d Modell 260 und mit dem 2-Kolben-System - wie schon im methodischen Teil angegeben - gewonnen. Es ist möglich durch die Auswahl verschiedener Gradienten die Abstände zwischen den einzelnen Peaks beliebig

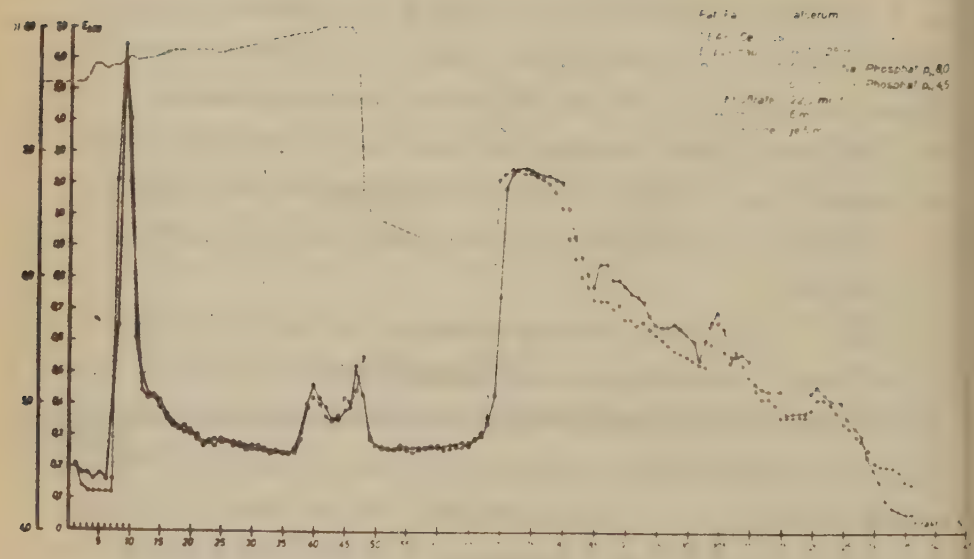


Abbildung 16

Säulenchromatographische Untersuchung eines Normalserums mit Doppel
saulentechnik.

kürzer oder länger zu gestalten und auch die ganze Elutionszeit zu verkürzen oder zu verlängern. Die richtige Auswahl der Gradienten ist eine der wichtigsten Vorbedingungen zum Gelingen eines chromatographischen Versuches und muß durch Vorversuche bestimmt werden.

5.2 Serum von Patienten mit γ-G-Paraproteinämie

Es wurden 35 γ-G-Paraproteinämien chromatographisch untersucht. Die Seren stammten von Patienten, bei denen die Diagnose Myelom sowohl klinisch, röntgenologisch, elektrophoretisch, immunologisch als auch mittels Sternalpunktion und eventueller Myelotomie und durch Sedimentationsanalyse (Ultrazentrifugen-Untersuchung) gesichert war. Die Chromatogramme, gewonnen durch Gradientenelutionschromatographie an DEAE-Cellulose-Säulen, zeigten in dem Verteilungsmuster der einzelnen Zacken bei 29 Myelomfällen keinen wesentlichen Unterschied zu dem eines Normalserums. Bei 6 Fällen bestand ein zusätzlicher abnormer Peak, welcher das Paraprotein enthielt. Auffallend war bei der ersten Gruppe eine breite und/oder sehr hohe γ-Globulin-Zacke (der erste chromatographische Peak), der in dieser Form bei keinem der Normalseren zu beobachten war. Entsprechend war die Albuminzacke und bei einigen Fällen auch die Siderophilin-Zacke kleiner als bei Normalfällen. Als Beispiel solcher Fälle sei das Chromatogramm des Pat. Mü. hier wiedergegeben (Abb. 17). Wie aus dieser Abbildung ersichtlich ist, ist die γ-Globulin-Zacke exessiv hoch und sehr schmal (vergleiche dazu Abb. 12). Siderophilin- und Albumin-Peak

sind im Vergleich zu dem Normalfall sehr klein. Eine Trennung des normalen Teils des γ-G-Globulins von dem ihm verwandten γ-G-Paraprotein war auch bei wiederholten chromatographischen Untersuchungen, unter Verwendung verschieden großer Säulen und verschiedener Gradienten, an DEAE-Cellulose nicht möglich. Lediglich bei 2 von diesen 29 Fällen ist es uns gelungen mittels Gradientenelutions-Chromatographie dieser Seren an DEAE-Sephadex doch noch eine Trennung zwischen dem normalen γ-G-Anteil und seinem abnorm strukturierten Varianten(γ-G-Paraprotein) zu erzielen.(Dazu siehe Seite 122).Ob das Nichtgelingen der Trennung bei den übrigen Fällen mehr ein methodisches Problem darstellt oder auf die Entartung der gesamten γ-G-Globuline zurückzuführen ist, kann nicht beantwortet werden. Es scheint jedoch bei den Fällen, die eine sehr schmalbasige und hohe chromatographische Zacke (wie in Abbild.17) aufweisen um eine Entartung des gesamten γ-G-Globulins zu handeln und bei denjenigen, die mehr eine breite Zacke haben, daß das Nichtgelingen der Trennung zur Zeit auf methodische Insuffizienz beruht.

Das in den Elutionsfraktionen der ersten chromatographischen Zacke (Fraktion 5-18 in der Abb.17) vorkommende Protein wanderte in der Papierelektrophorese einheitlich und war im Vergleich mit der Elektrophorese des Vollserums mit dem Paraprotein völlig identisch(Abb.18). Der Beweis der immunologischen Reinheit des isolierten Paraproteins konnte mittels Immunelektrophorese, modifizierte Immunelektrophorese nach Ossermann sowie auch im Ouchterlony-Agardiffusionstest erbracht werden. Bei der Ultrazentrifugenuntersuchung entsprach der erste Peak des Elutionschromatogramms einem Protein mit S_{20w} um 7 S und wanderte genau so schnell wie das γ-G-Paraprotein im Vollserum.

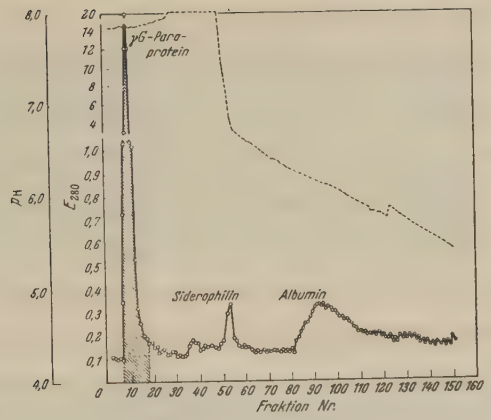


Abbildung 17

Säulenchromatographische Trennung des Serums eines Patienten mit Gamma-G-Paraproteinämie. Säule: 1,7x32 cm. Anfangspuffer: 500 ml 0,01 mol Na-Phosphat pH 8,0. Grenzpuffer: 250 ml 0,5 mol Na-Phosphat pH 4,5. Durchflußrate: 22,5 ml/Std. Fraktionen a 6 ml. Auftragsmenge: 6 ml.

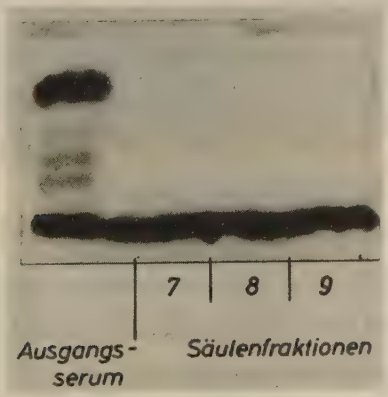


Abbildung 18

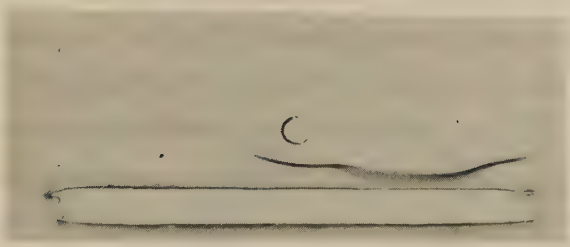
Elektrophoretische Untersuchung säulenchromatographisch isoliertem Gamma-G-Paraprotein (Fraktion 7,8,9 der Abbildung 17).

Abb.19a zeigt die modifizierte Immunelektrophorese nach Ossermann des Vollserums (Antigenreservoir) und das isolierte Paraprotein (Rille unterhalb des Antigenreservoirs) im Ansatz mit Anti-γ-Globulin-Immunserum vom Kaninchen(in der Rille oberhalb des Antigenreservoirs).Die durchgehende Linie(sowohl die eigentliche γ-Globulin-Präzipitationslinie als auch die feine Zusatzlinie)beweist die völlige Identität des isolierten Proteins mit dem Paraprotein des Vollserums.

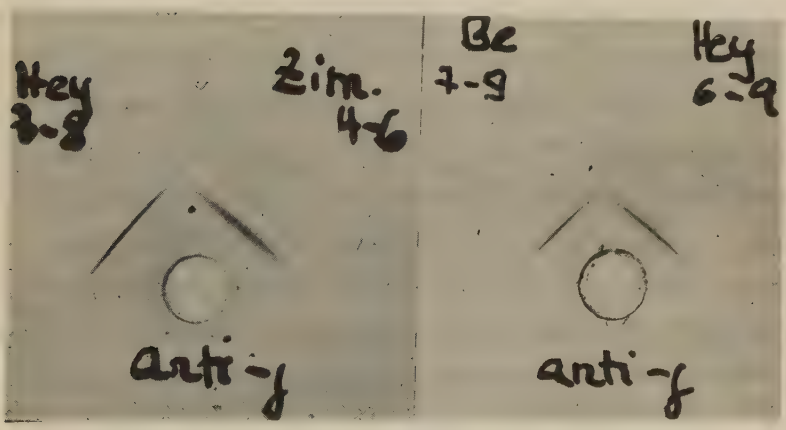
Es zeigte sich,daß die isolierten γ-G-Paraproteine aller von uns untersuchten Paraproteinämieseren mit derselben Kettenspezifität miteinander verwandt sind und im Ouchterlony-Diffusionstest keine sogenannte Spornbildung bilden,wie aus Abb.19$_{b+c}$ ersichtlich ist.

Bei 6 Myelomfällen wurde,wie schon erwähnt,das γ-G-Paraprotein, getrennt vom normalen γ-G-Anteil,an einer Stelle des Chromatogramms eluiert,an der bei Normalseren nur nach starker Konzentrierung der Fraktionen Spuren von γ-G-Globulin nachweisbar war.In diesem Bereich war jedoch bei Untersuchung aller Normalseren und Seren mit starker Dysproteinämie keine chromatographischen Peaks,wie es bei diesen 6 Fällen der Fall war,auszumachen.Zwei dieser Fälle sollen hier näher erörtert werden.

Bei Pat.Zo. handelt es sich um ein klinisch,röntgenologisch,sedimentationsanalytisch sowie durch Sternalpunktion gesichertes γ-G-Plasmocytom mit γ-Mobilität.Die γ-Globulin-Präzipitationslinie zeigte in der Immunelektrophorese des Vollserums im Ansatz mit Antihuman-Kaninchenimmunserum eine Ausbuchtung,sowie eine zusätzliche Präzipitationslinie,die kathodisch und anodisch in die γ-Globulinlinie einmündet.Dieser Befund war bei Verwendung eines Anti-γ-Globulin-Serums auch in höherer Verdünnung konstant.



a



b

c

Abbildung 19

a)Modifizierte Immunelektrophorese nach Ossermann zur Feststellung der Identität der isolierten Paraproteinfraktion mit der des Vollserums.Erklärung siehe Text Seite 118.
b und c)Nachweis der immunologischen Identität verschiedener isolierter Gamma-G-Paraproteine.

Die übrigen Präzipitationslinien waren außer dem Fehlen von γ-A und γ-M völlig normal. Dieses Serum wurde sowohl mittels Doppelsäulentechnik-gemeinsam mit einem Normalserum -untersucht als auch mittels verschieden großer Säulen. In Abb.2o ist das Serumchromatogramm ,das durch eine kontinuierliche Gradienten= elution an einer 1,5 x 95 cm großen DEAE-Cellulosesäule gewonnen wurde, dargestellt. Die 1. chromatographische Zacke ist in diesen beiden Chromatogrammen(Abb.2o) bedeutend kleiner im Vergleich zum Normalserum und enthält elektrophoretisch reines γ-G-Glo= bulin(Abb.21,22_a). Das γ-Globulin, enthalten in den Elutionsfrak= tionen dieses Bereiches hat in der Immunelektrophorese im Ansatz mit Antihuman-Immunserum vom Kaninchen(unterhalb der Antikörper= rille in Abb.22 a) eine normale, jedoch abgeschwächte und ver= kürzte Präzipitationslinie. Eine Ausbuchtung oder/und zusätzliche Präzipitationslinie wie im Vollserum(oberhalb der Antikörperril= le)war nicht zu erkennen. Es ist auf Grund der Elektrophorese sowie des Immunelektrophoresediagramms anzunehmen, daß dieses Protein dem noch vorhandenen restlichen Gamma-G-Globulin bei Pa= tient Zo. entspricht. Die anormale Elutionszacke, die die Parapro= teinfraktion enthält, erscheint knapp vor dem Albumin - an einer Stelle also, an der im Normalserum im Vergleich kein Peak zu er= sehen ist. Der Übergang in die Albuminzacke war bei allen kleine= ren Säulen fließend. Dieser Befund war bei wiederholter Untersuchung - auch bei Säulen von 2,5 x 32 cm Dimensionen - konstant.
Eine einwandfreie Trennung dieser pathologischen Elutionszacke von der Albuminzacke war nur mittels einer 2,5 x 78 cm und noch besser an einer 1,5 x 9o cm großen Säule möglich. Das ist anderer= seits ein experimenteller Beweis dafür, daß die Trennung an einer

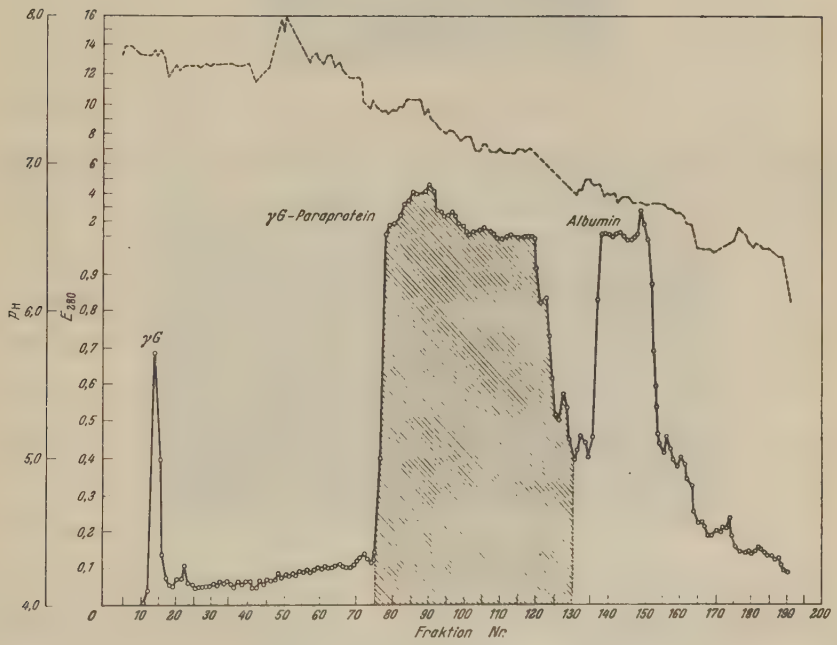


Abbildung 2o

Säulenchromatographische Untersuchung des Serums des Patienten Zo. (IgG-Paraproteinämie). Austauscher: DEAE-Cellulose. Säule: 1,5x95 cm. Anfangspuffer: 2ooo ml o,ol mol Tris-HCl-Puffer pH 8,o. Grenzpuffer: o,3 mol Tris-HCl-Puffer pH 4,5. Durchflussrate: 26 ml/Std. Fraktionen a 13 ml. Auftragsvolumen: 3o ml.

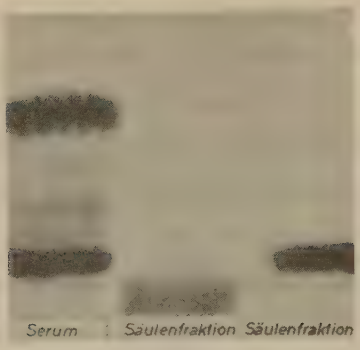


Abbildung 21

Vergleichende elektrophoretische Trennung des Ausgangsserums, des mittels Säulenchromatographie (Abb.2o) isolierten normalen IgG (Mitte) und des isolierten IgG-Paraproteins (rechts).

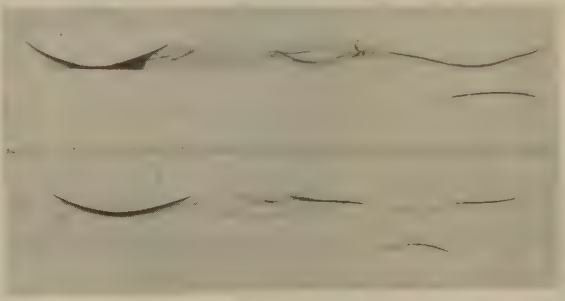


Abbildung 22

Immunelektrophoretische Untersuchung des Serums (jeweils oberhalb der Antikörperrille) und des säulenchromatographisch isolierten normalen IgG (a) und des isolierten IgG-Paraproteins (b) des Patienten Zo. im Ansatz gegen Antihumanserum vom Kaninchen.

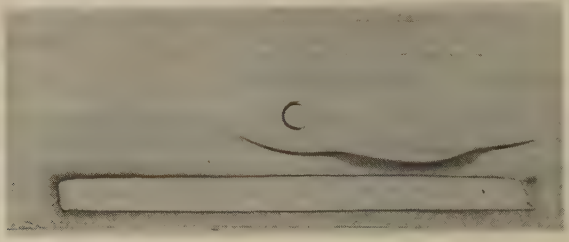


Abbildung 23

Modifizierte Immunelektrophorese nach Ossermann zur Feststellung der Identität der isolierten Paraproteinfraktion mit der des Vollserums des Patienten.

schlanken und langen Säule(die theoretische Grundlage für dieses Phänomen ist in einem früheren Kapitel schon besprochen) sich viel besser gestaltet.Das Protein,enthalten in der pathologischen Elutionszacke,konnte in der Elektrophorese als reines γ-G-Globulin charakteresiert und bei Vergleich mit der Elektrophorese des Vollserums mit der pathologischen Komponente desselben identifiziert werden.In der Abbildung 21 sind die beiden Proteine, enthalten im ersten und dem pathologischen Peak ,im Vergleich zum Normalserum elektrophoretisch dargestellt.Der Beweis der immunologischen Reinheit dieses Paraproteins konnte mittels Immunelektrophorese im Ansatz gegen Antihuman-Kaninchenserum erbracht werden.Wie aus Abbildung 22 b zu ersehen ist,ist diese γ-Globulinlinie (unterhalb der Antikörperrille) verkürzt und abgerundet.Im Vergleich zur γ-Präzipitationslinie des Vollserums (oberhalb der Antikörperrille)liegt diese Präzipitationslinie im Bereich der Ausbuchtung der Präzipitationslinie des Vollserums. Eine zusätzliche Präzipitationslinie ist bei dieser isolierten Fraktion nicht zu erkennen.Sowohl im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest wie auch in der modifizierten Immunelektrophorese nach Ossermann zeigte sich die isolierte Paraproteinfraktion mit dem Paraprotein des Vollserums völlig identisch(Abb.23).
Wie aus Abbildung 23 zu ersehen ist,kommt zwischen den beiden Rillen auf der anodischen Seite des Antigenreservoirs nur eine gerade Präzipitationslinie zur Darstellung,welche einwandfrei in die pathologisch deformierte γ-Linie übergeht.Auf der konkaven Seite der pathologischen γ-G-Linie ist eine zusätzliche gerade Linie dargestellt,die kathodisch in die pathologische γ-G-Linie einmündet - auf der anodischen Seite jedoch frei endet (siehe Diskussion).

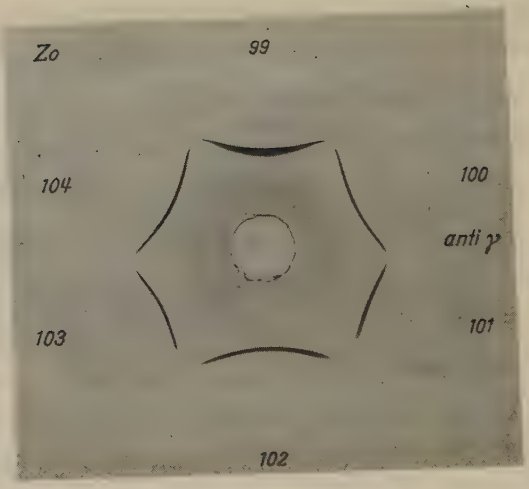


Abbildung 24

Identitätsnachweis der einzelnen gewonnenen Fraktionen (99-1o4, Abb.2o) mit der Ouchterlony-Doppeldiffusionsmethode.

Eine immunologische Differenz zwischen den einzelnen nacheinander folgenden Fraktionen in der abnormen Chromatographiezacke konnte im Ouchterlony-Rosettentest nicht festgestellt werden. Die Abbildung 24 läßt erkennen, daß die einzelnen Präzipitationslinien ohne Spornbildung einwandfrei ineinander übergehen. Eine Spornbildung konnte zwischen diesem Paraprotein und seinem normalen γ-G-Anteil nicht festgestellt werden.

Bei dem Patienten Bü. handelte es sich ebenfalls um ein gesichertes γ-G-Plasmocytom mit elektrophoretischer ß-Beweglichkeit des Paraproteins. Die γ-Globulin-Präzipitationslinie war in dem Immunelektrophorese-Diagramm des Vollserums im Ansatz mit Anti-Human-Immunserum vom Kaninchen stark ausgebuchtet. Eine zusätzliche Präzipitationslinie konnte nicht festgestellt werden. Der Befund war bei Verwendung eines Anti-γ-Globulin-Immunserums vom Kaninchen noch deutlicher.

Das Chromatogramm dieses Serums zeigte im Bereich der Fraktionen 7 - 11 eine sehr kleine Zacke mit höchstem Extinktionswert (bei 28o m) von o,24o, die wahrscheinlich das geringe restliche γ-G-Globulin enthält. Dieser Peak ist gegenüber dem γ-Globulin-Peak eines Normalserums stark verkleinert. Dagegen kommt im Bereich der Elutionsfraktion 26 - 59 eine ungewöhnlich hohe Zacke zur Darstellung, die in dieser Form bei keinem Chromatogramm der Normal- oder der Dysproteinämieseren zu sehen war. Das Protein, enthalten in der Elutionsfraktion 26 - 42, konnte in der Papierelektrophorese als ein einheitliches Protein charakterisiert und bei m Vergleich mit der Elektrophorese des Vollserums mit der pathologischen ß-Komponente desselben identifiziert werden.

Der Beweis der immunologischen Reinheit konnte mittels Immunelektrophorese erbracht werden. Die Immunpräzipitationslinie dieses Proteins ist bogenförmig und entspricht rein formal der γ-Globulinlinie des Vollserums. Sowohl im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest als auch in der modifizierten Immunelektrophorese nach Ossermann war die Identifizierung dieses Proteins mit dem Paraprotein des Vollserums möglich. Eine sogenannte Spornbildung im Ouchterlony-Diffusionstest zwischen dem isolierten Paraprotein des Pat.Bü. und dem isolierten γ-G-Globulin eines Normalserums konnte nicht festgestellt werden.

Eine weitere Untersuchung des normalen γ-G-Globulins, enthalten in den Fraktionen 7-11 konnte leider nicht durchgeführt werden, da uns dieses bei der Verarbeitung verloren ging und nicht wieder zu beschaffen war. Es ist noch hinzuzufügen, daß in den Fraktionen 43-49 ebenfalls Paraprotein gefunden wurde, jedoch nicht in reiner Form sondern mit Beimengung von Siderophilin.
Unser Ziel war darauf gerichtet, wie schon im vorigen Kapitel berichtet, soweit es möglich war - das Paraprotein von dem ihm nah verwandten γ-G-Anteil zu trennen. Bei 6 Fällen, bei denen die pathologische Fraktion an einer ungewöhnlichen Stelle des Chromatogramms eluiert wurde, konnte dieses Ziel mittels Gradientenelutionschromatographie an DEAE-Cellulose erreicht werden. Bei allen anderen γ-G-Paraproteinämien war jedoch auch bei Verwendung verschieden großer Säulen und Anwendung von verschiedenen Puffergradienten diese Trennung nicht möglich. Erst mittels Gradienten-Elutionschromatographie an DEAE-Sepahadex wurde es bei weiteren 2 Fällen möglich den pathologischen Anteil des γ-G-Paraproteins vom normalen Anteil zu trennen.

Diese beiden Fälle sollen hier besprochen werden:
Bei Pat.Ba. und Pat. Re.handelte es sich um ein klinisch so= wie durch Sternalpunktion und Myelotomie gesichertes Myelom. Das Gesamteiweiß betrug bei Pat.Ba.14,o g% und bei Pat.Re. lo,2 g%(Biuret-Bestimmung).In der Elektrophorese war ein sehr schmaler und hoher M-Gradient mit γ - Mobilität festzustellen. Der M-Gradient betrug bei Pat.Ba.7,73 g% und bei Pat.Re. 5,8 g% .Die Albumine waren bei beiden Seren vermindert.In den Immunelektrophoresediagrammen beider Vollseren im Ansatz mit Anti-Human-Kaninchenimmunserum war die γ-Globulin Präzi= pitationslinie pathologisch ausgebuchtet. Außerdem war bei beiden im mittleren Abschnitt der pathologisch deformierten γ-Globulin-Präzipitationslinie auf der Konkavseite eine zusätzliche feine Präzipitationslinie festzustellen,die sowohl kathodisch als auch anodisch in die γ-Globulin-Präzipitationslinie einmündete. Die sehr starke Vermehrung des γ-Paraproteins bewirkte bei Pa= tient Ba.in beschriebener mittlerer Linie eine partielle Auf= lösung infolge des Antigenüberschusses.Diese Veränderung kam bei Verwendung von Anti-γ-Globulin-Kaninchenimmunserum noch deut= licher zum Vorschein.Die γ-A-und γ-M-Linien waren nicht auszu= machen,die übrigen Präzipitationslinien normal ausgebildet.
Die Chromatogramme dieser beiden Seren,gewonnen durch Gradienten-Elutionschromatographie an DEAE-Cellulose,waren lediglich durch eine sehr hohe und breite Gammazacke - das ist die erste chro= matographische Zacke - auffällig.Ein gesonderter Paraprotein-Peak wurde nicht gewonnen.Das isolierte Protein dieser ersten Zacke zeigte in der Immunelektrophorese dasselbe Bild wie für das Vollserum beschrieben.Die Gradientenelutionschromatographie

an DEAE-Sephadexsäulen brachte jedoch bei beiden Fällen eine einwandfreie Trennung zwischen dem normalen Gamma-G-Globulin und dem Gamma-G-Paraprotein.Bei beiden Fällen erschien nämlich eine von dem ersten Peak einwandfrei getrennte,hohe und in ihrer Lokalisation abnorme Zacke im Chromatogramm.Diese Zacke nahm im Chromatogramm des Pat.Re.einen breiten Raum ein(beginnend kurz vor der ersten Zacke,endend kurz vor der Albuminzacke).Im ersten Abschnitt enthielt sie elektrophoretisch sowie immunelektrophoretisch reines Paraprotein,im zweiten Abschnitt jedoch Paraprotein mit Siderophilinbeimengungen.Eine getrennte Siderophilinzacke kam nicht zur Darstellung.Bei Patient Ba.erschien der Paraprotein-Peak als ein scharfer,sehr hoher und symetrischer Gipfel zwischen der Gammaglobulinzacke(1.Peak) und der Siderophilin-Zacke,-sie war von beiden genannten Proteinen scharf getrennt.Dieses Chromatogramm entstand durch Gradientenelutionschromatographie an einer 2,5 x 21 cm großen Säule(Pharmacia-Säule) - der Gradient wurde mittels Varigrad Modell 260 aufgestellt.Die 1. und 2. Varigradkammer war mit jeweils 400 ml 0,05 mol Tris HCL-Puffer pH 8,0 und die 3.Kammer mit 400 ml 0,5 mol Tris-HCl-Puffer pH 4,5 gefüllt.Die Säule wurde vor dem Versuch mit einem 0,05 mol Tris HCl-Puffer pH 8,0 equilibriert.Ein Druck wurde während der Elution nicht verwendet.Das Chromatogramm besteht aus 4 Hauptzacken,die gegeneinander gut abgesetzt sind.Die 1.Zacke(Fraktion 10-20),die im Vergleich zum Normalserum sehr klein ist und kurz nach dem Auftragen des Serums auf die Säule in Erscheinung tritt,enthält ein Protein mit elektrophoretischer Gamma-Mobilität.

Dieses Protein wandert in der Papierelektrophorese einheitlich, langsamer als die Paraproteinfraktion des Vollserums und hat in der Immunelektrophorese eine abgeschwächte und verkürzte γ-Präzipitationslinie ohne eine pathologische Ausbuchtung oder/ und Zusatzlinie. Auf Grund der vergleichenden Papierelektrophorese sowie des Immunelektrophoresediagramms muß es sich rein formal gesehen um das restliche, noch normale γ-Globulin beim Patienten handeln. Derselbe Befund wurde auch in der 1. chromatographischen Zacke des Patienten Re. erhoben. Die 2. sehr hohe scharfe und symetrische chromatographische Zacke, die im Normalserum nie zu sehen ist, enthält ebenfalls ein elektrophoretisch einheitliches Protein mit γ-Mobilität. In der Elektrophorese wandert es mit derselben Geschwindigkeit wie das Paraprotein des Vollserums, jedoch schneller als das isolierte Protein in der vorangehenden Zacke. Die Immunpräzipitationslinie dieses isolierten Proteins zeigt sich als eine einzige symetrisch gebogene Linie. Lokalisatorisch ist sie im Bereich der Ausbuchtung der γ-G-Präzipitationslinie des Vollserums. Eine zusätzliche feine Präzipitationslinie wie im Vollserum ist nicht zu erkennen. Auf Grund des Papierelektrophoresebildes und des Immunelektrophoresediagramms muß es sich bei diesem Protein um das elektrophoretisch sowie immunelektrophoretisch einheitliche Paraprotein handeln. Im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest war dieses Protein mit dem Paraprotein des Vollserums identisch.

5.3 γ-A-Paraproteinämien

Bei den 2o zu dieser Gruppe gehörenden Fällen war im Immunelektrophoresediagramm die γ-A-Globulin-Präzipitationslinie im Ansatz mit Antihuman-Kaninchenimmunserum und des spezifischen Anti-γ-A-Globulin-Immunserum massiv verstärkt, symetrisch gebogen und mündete kathodisch in die γ-Globulin-Präzipitationslinie ein. Die γ-Globulin-Präzipitationslinie war bei diesen 2o Fällen abgeschwächt Die γ-M-Präzipitationslinie kam meist nicht zur Darstellung. Das γ-A-Paraprotein bestand sedimentationsanalytisch meist aus mehreren Globulinfraktionen mit unterschiedlicher Sedimentationskonstante. Hauptsächlich waren Proteine mit der Sedimentationskonstante S_{2oW} =9, S_{W2o} = 7, $S_{2o\ W}$ = 12 vermehrt. Klinisch handelte es sich bei 19 Fällen um ein gesichertes Plasmocytom, bei einem Fall (Pat.Ka.) um eine Paraproteinämie bei Pyodermia ulcerosa serpingiosa (Dermatitis ulcerosa). Dieser Fall wurde von R ö c k l, K n e d e l und S c h r ö p l beschrieben.

Die Verteilung der chromatographischen Peaks war bei 17 dieser Fälle grundsätzlich die gleiche. Auffallend war eine abnorm hohe und breite Zacke nach dem Albuminpeak bei Verkleinerung der ersten (γ-Zacke). Die hohe Postalbuminzacke (Fraktion 94-122 in Abb. 25) enthielt ein Protein, das in seiner immunologischen und elektrophoretischen Eigenschaft dem γ-A-Paraprotein des Vollserums gleichzusetzen war (Abbildung 26). Soweit es sich um die elektrophoretische und immunelektrophoretische Charakteresierung handelt, war das isolierte γ-A-Paraprotein - enthalten in der abnormen Chromatographiezacke (Fraktionen 96-1o5 in Abb. 25) - auch nach Konzentrierung dieser Fraktionen einheitlich.

Abbildung 26 zeigt das Immunelektrophoresediagramm des Vollserums (oberhalb der Antikörperrille) und das chromatographisch isolierte γ-A-Paraprotein (unterhalb der Antikörperrille)im Ansatz mit Antihuman-Kaninchenantiserum.Unterhalb der Antikörperrille kommt eine stark ausgeprägte pathologisch verbogene Präzipitationslinie zur Darstellung.Diese Linie entspricht,wie aus Abb. 26 gut zu ersehen ist,der stark ausgeprägten pathologisch verbogenen γ-A-Präzipitationslinie des Vollserums.

Die erste chromatographische Zacke(Fraktion 10-14 in Abb.25) enthält ein Protein,daß nach seiner elektrophoretischen wie auch immunelektrophoretischen Eigenschaft dem noch normalen, jedoch verminderten γ-G-Globulin des Vollserums entspricht.

Im Ouchterlony-Agar-Diffusionstest zeigte sich,daß das isolierte γ-A-Paraprotein nur eine partielle Antigengemeinschaft mit dem normalen 7S-γ-Globulin desselben Serums aufweist.Eine partielle Antigengemeinschaft wurde auch zwischen diesem γ-A-Paraprotein und dem normalen γ-G-Globulin eines Normalserums nachgewiesen. Untereinander erwiesen sich jedoch die von uns untersuchten und isolierten γ-A-Paraproteine antigenanalytisch im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest identisch.Eine doppelte Spornbildung konnten wir zwischen diesem γ-A-Paraprotein und anderen von uns untersuchten γ-G-Paraproteinen im Ansatz mit Antihuman-sowie Anti-γ-Globulin - Kaninchenimmunserum feststellen.

Bei einer der untersuchten γ-A-Paraproteinämien erschien hier das pathologische Protein in einem breiten Abschnitt des Chromatogramms - und zwar anfangend im Postsiderophilin-Bereich und endend mit der Albuminzacke.In reiner Form war dieses γ-A-Paraprotein jedoch in einem kurzen Abschnitt im Postsiderophilin-Bereich zu finden.In allen anderen Fraktionen

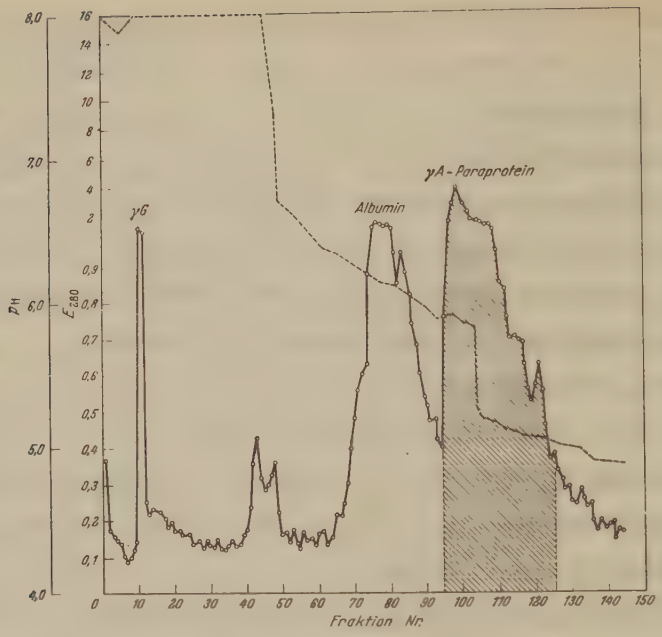


Abbildung 25

Säulenchromatographische Untersuchung des Serums des Patienten Hu. mit IgA-Paraproteinämie. Austauschermaterial: DEAE-Cellulose, Säule: 1,7x30 cm. Puffer: o,o1 mol Na-Phosphat pH 8,o und o,3 mol Na-Phosphat pH 4,5, Durchflußrate: 23,5 ml/Std., Fraktionen a 6 ml, Auftragsmenge: 5 ml.

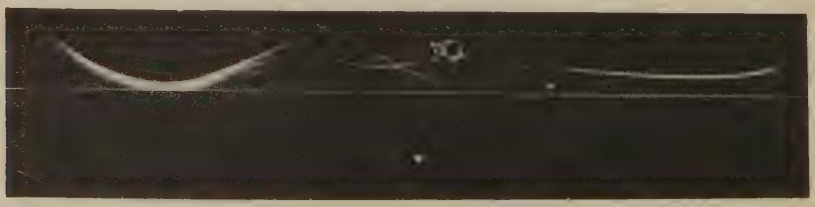


Abbildung 26

Immunelektrophoretische Untersuchung des isolierten IgA-Paraproteins (unterhalb der Antikörperrille) und des Ausgangsserums (Patient Hu.) im Ansatz mit Antihumanserum vom Kaninchen.

war es mit Albumin, α_1, α_2 und ß-Globulinen vermischt. Ein Unterschied im elektrophoretischen sowie immunelektrophoretischen Verhalten dieses γ-A-Paraproteins und den anderen untersuchten γ-A-Paraproteinen konnte nicht festgestellt werden. Bei zwei Fällen wurde das Paraprotein mit Albumin vermischt zusammen eluiert. Durch Rechromatographie an Sephadex G 150 und nachträglicher kartonelektrophoretischer Isolierung konnte dann das Paraprotein in reiner Form dargestellt werden.

5.4 γ-M-Paraproteinämie

Die Immunelektrophoresediagramme der 14 Seren dieser Gruppe, die zur chromatographischen Untersuchung verwendet wurden, zeigten im Ansatz mit Antihuman-Immunserum vom Pferd und dem spezifischen Anti-γ-M-Pferdeimmunserum eine massive Verstärkung der γ-M-Linie, die auch bei höherer Verdünnung des Serums nachweisbar war. In einigen Fällen zeigte die γ-M-Präzipitationslinie eine pathologisch doppelt gebogene Verlaufsform. Bei 6 Fällen blieb ein Teil der Makroglobuline an der Auftragsstelle liegen und präzipitierte dort. Mit Antihuman-Kaninchenserum kam der Befund nicht so gut zur Darstellung wie mit Antihuman-Pferdeimmunserum. Die γ-G-Globulinpräzipitationslinie hatte in einigen Fällen eine völlig normale Verlaufsform und in anderen Fällen (z.B. Pat. Si.) war sie im ganzen abgeschwächt und der anodische Teil verkürzt. Sedimentationsanalytisch bestand bei allen Fällen eine signifikante Vermehrung der Makroglobulinfraktion (S_{20w} lag bei den einzelnen Fällen bei 15-29).

Wir verwendeten als Ionenaustauscher bei diesen Chromatographien sowohl DEAE-Sephadex als auch DEAE-Cellulose; es scheint jedoch, daß mit der Chromatographie an DEAE-Sephadexsäulen eine viel bessere Trennung zu erzielen ist als mit DEAE-Cellulosesäulen. Das allgemeine chromatographische Muster war mit Auftreten eines abnormen Peaks am Ende des Chromatogramms bei allen diesen Fällen grundsätzlich dasselbe.Unterschiedlich war lediglich die Höhe und die Breite dieser abnormen Zacke bei verschiedenen Seren. Abbildung zeigt das Chromatogramm einer dieser Fälle(Pat.Pä.), gewonnen durch Chromatographie an DEAE-Cellulose und Abbildung 28 das Chromatogramm des Patienten Si. an einer 2,5 x 2o cm großen DEAE-Sephadex-Säule.Dieses zuletzt genannte Chromatogramm soll als Beispiel hier näher erörtert werden.

Ein geradliniger Puffe gradient mit abfallendem pH und steigender Ionenkonzentration wurde mittels Varigrad (2-Kammersystem) hergestellt.Das im Bereich der ersten chromatographischen Zacke (Fraktion 6-2o in Abb.28) isolierte Protein wanderte in der Papierelektrophorese einheitlich und war im Vergleich mit der Elektrophorese des Vollserums mit dem γ-G-Globulin desselben gleichzusetzen (Abb.29a).In dem Immunelektrophoresediagramm im Ansatz mit Antihuman-Pferdeimmunserum zeigte sich dieses Protein ebenfalls einheitlich.Ihre Präzipitationslinie war im Vergleich zum Vollserum mit dem γ-G-Globulin identisch.Dieser Befund kam bei Verwendung eines Antigammaglobulin-Kaninchenimmunserum noch deutlicher hervor.Im Ansatz mit Anti-γ-M-Pferdeimmunserum konnte keine Präzipitationslinie festgestellt werden.Somit ist dieses Protein mit dem noch normalen 7S-γ-Globulin des Vollserums gleichzusetzen.

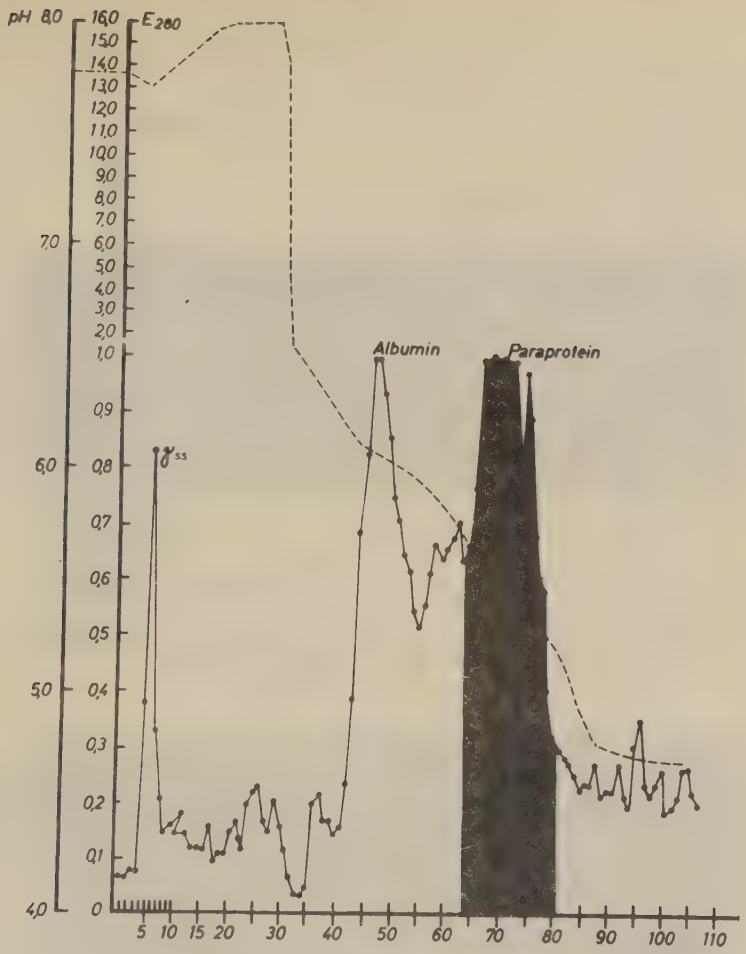


Abbildung 27

Säulenchromatographische Untersuchungen des Serums des Patienten Pa. mit IgM-Paraproteinämie (M. Waldenström).
Austauschermaterial: DEAE-Cellulose, Säule: 1,0 x 30 cm, Anfangspuffer: 0,01 mol Na-Phosphatpuffer pH 8,0, Grenzpuffer: 0,3 mol Na-Phosphatpuffer pH 4,5, Durchflußrate 15 ml/Std., Fraktionen a 4 ml, Auftragsvolumen 1 ml.

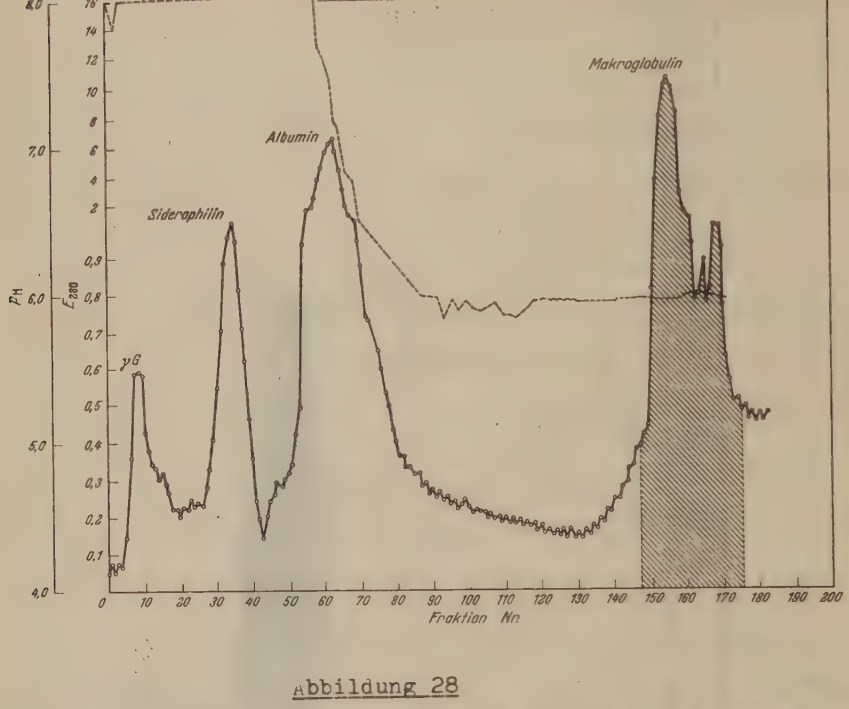


Abbildung 28

Säulenchromatographische Untersuchung des Serums des Patienten Si. (M.waldenström), Austauschermaterial: DEAE-Sephadex, Säule: 2,5 x 2o cm, Anfangspuffer: 4oo ml o,o5 mol Na-Phosphat pH 8,o, Grenzpuffer: 4oo ml o,5 mol Na-Phosphat Ph 4,5, Durchflußrate: 8 ml/Std., Fraktionen a 4 ml, Auftragsmenge: 15 ml, Gradient: Varigrad (2-Kammer-System).

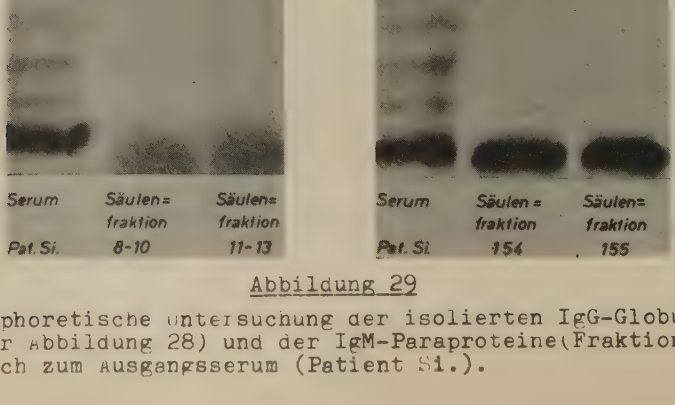
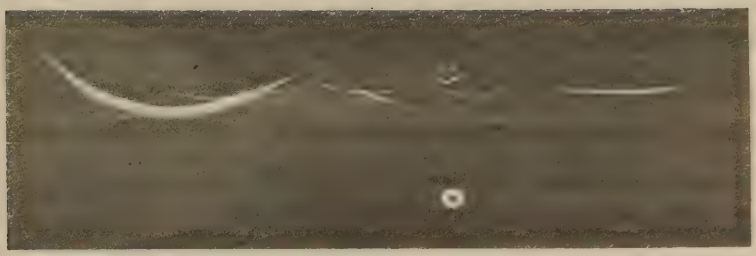
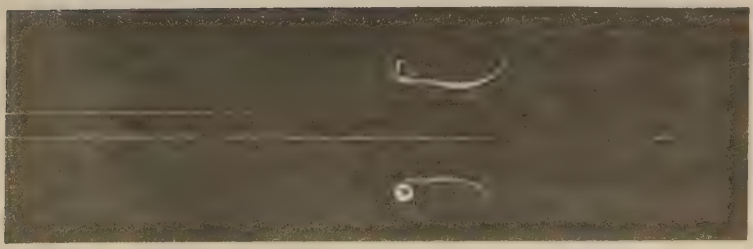


Abbildung 29

Elektrophoretische Untersuchung der isolierten IgG-Globuline (Fraktionen 8-13 der Abbildung 28) und der IgM-Paraproteine (Fraktionen 154-155) im Vergleich zum Ausgangsserum (Patient Si.).



a



b

Abbildung 3o

Immunelektrophorese des isolierten Makroglobulins(jeweils unterhalb der Antikörperrille)im Vergleich zum Vollserum (oberhalb der Antikörperrill
a)im Ansatz mit Antihumanserum vom Kaninchen
b)im Ansatz mit Anti-IgM-Serum vom Pferd

Der 2.Peak enthielt hauptsächlich Siderophilin und der 3.Peak Albumin, α_1 und α_2.

Die 4.chromatographische Zacke mit ihren Nachschwankungen enthielt ein Protein mit der elektrophoretischen Mobilität des M-Gradienten des Vollserums und konnte in reiner Form in Fraktion 15o - 17o gewonnen werden(Abb.3o b).In Abb.3o a ist die Immunelektrophorese des Vollserums(oberhalb der Antikörperrille) und des isolierten γ-M-Proteins (unterhalb der Antikörperrille) im Ansatz mit Antihuman-γ-M-Pferdeimmunserum wiedergegeben.Wie aus beiden Abbildungen zu ersehen ist,zeigt die Präzipitationslinie des isolierten Proteins eine eindeutig doppelt gebogene Linie und liegt im Vergleich zum Vollserum im Bereich der γ-M-Paraproteinlinie desselben.Nach der Form,Lokalisation und dem immunologischen Verhalten zu urteilen,muß es sich bei diesem Protein um das γ-M-Paraprotein des Vollserums handeln,das chromatographisch in elektrophoretisch sowie immunelektrophoretisch reiner Form isoliert wurde.

Das sogenannte α_2-Plasmocytom

Wir hatten Gelegenheit 2 in diese Gruppe gehörende Seren chromatographisch zu untersuchen.Bei beiden Fällen (Pat.Po.und Pat.Gm.) handelt es sich um klinisch,röntgenologisch,elektrophoretisch und immunelektrophoretisch sowie histologisch gesicherte Plasmocytome mit stark ausgeprägter Bence-Jones-Proteinurie.Ein enorm hoher und schmalbasiger α_2-Gradient in der Elektrophorese war diesen beiden Fällen eigen.Bei diesen 2 Paraproteinämien zeigte die γ-Globulin-Präzipitationslinie im Immun-

elektrophoresediagramm im Ansatz mit Anti-Human-Kaninchenimmunserum einen langgezogenen,jedoch abgeschwächten Verlauf und ging in eine symetrisch gebogene Linie im $Alpha_2$-Bereich über.An der Übergangsstelle war eine zusätzliche feine Präzipitationslinie zu sehen,die kathodisch in die Gamma-G-Globulin-Präzipitationslinie einmündet.
Bei Verwendung von Anti-Gamma-G-Globulinserum vom Kaninchen kamen die beschriebenen Veränderungen noch deutlicher hervor.Die Gamma-A- sowie die Gamma-M-Präzipitationslinien waren nicht auszumachen.
Diese kamen auch bei Verwendung von spezifischen Anti-Gamma-A-bzw. Anti-Gamma-M-Immunseren vom Kaninchen nicht zur Darstellung.
Bei Verwendung eines Anti-$Alpha_2$-Makroglobulinserums vom Kaninchen kam die $Alpha_2$-Makroglobulin-Präzipitationslinie an normaler Stelle mit normaler Ausprägung zur Darstellung.Eine Beziehung zwischen dieser Linie und dem Paraprotein des Serums konnte nicht nachgewiesen werden.Dasselbe gilt für $Alpha_2$-Haptoglobin.Das Verteilungsmuster der einzelnen chromatographischen Zacken war bei beiden Fällen im Prinzip das gleiche,sodaß hier nur der Fall Po. besprochen werden soll.
Beim Patient Po. handelte es sich,wie schon erwähnt,um ein gesichertes Myelom mit folgenden elektrophoretischen sowie sedimentationsanalytischen Befunden:Elektrophorese:Gesamteiweiß 9,23 g%,Albumin 44,2 rel%, $Alpha_1$ 4,o rel%,$Alpha_2$ 34,1 rel%,Beta 1o,3 rel%,Gamma 7,4 rel%.
S_{20w} 1993=2,47%,S_{20w} 7,14=41,3o%,S_{20w} 4,67=56,23%.
Abbildung 31 zeigt das Chromatogramm dieses Serums gewonnen durch Gradientenelutionschromatographie an einer 1,7 x 23 cm großen DEAE-Cellulose-Säule.Die verwendete Serummenge betrug 2 ml.
Die 1.chromatographische Zacke ist gegenüber dem gewohnten Bild bei den Normalseren sehr klein und enthält ein Protein mit der normalen Gamma-Globulin-Beweglichkeit.Elektrophoretisch ist es mit dem normalen Gamma-G-Anteil des Vollserums identisch,wie in Abb.32 gut erkennbar.

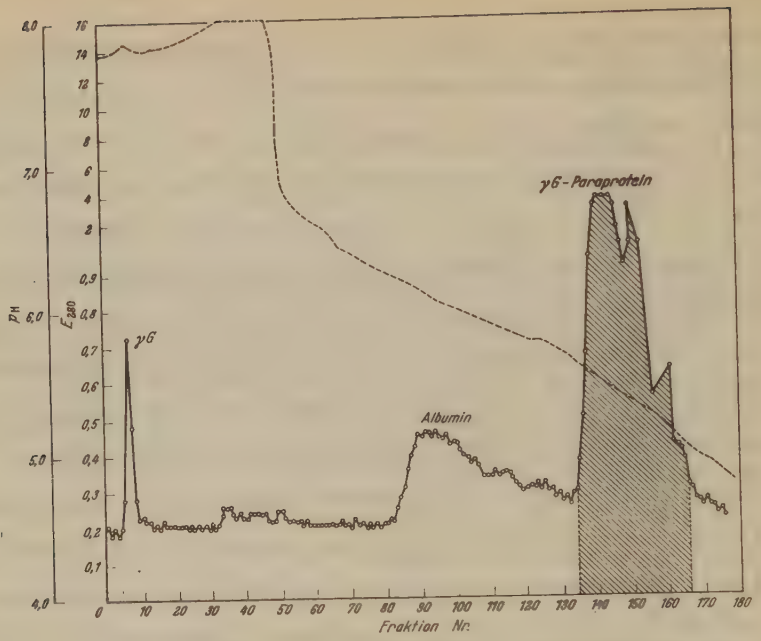


Abbildung 31

Das Säulenchromatogramm des Serums des Patienten Po.(IgG-Paraproteinämie mit Alpha$_2$-Mobilität).Säulenfüllung:DEAE-Cellulose,Säule:1,7x23 cm, Anfangspuffer:0,01 mol Na-Phosphatpuffer pH 8,0,Grenzpuffer:0,3 mol Na-Phosphatpuffer pH 4,5,Durchflußrate:23,5 ml/Std.,Fraktionen a 6 ml, Auftragsvolumen:2 ml.

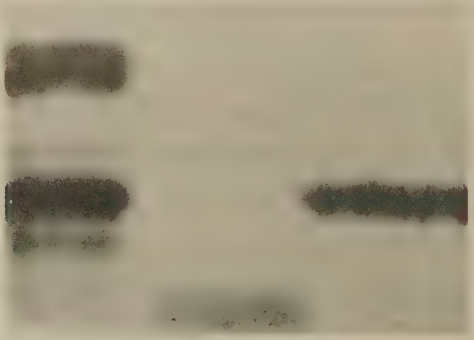


Abbildung 32

Vergleichende elektrophoretische Trennung des Ausgangsserums,des isolierten normalen IgG-Globulins(Mitte)und des isolierten IgG-Paraproteins mit Alpha$_2$-Mobilität(rechts).

In der Immunelektrophorese erwies sich dieses Protein als einheitlich. Es erschien als eine langgezogene Präzipitationslinie im Bereich der Gamma-G-Globuline bei Verwendung von Anti-Human-Kaninchen-Immunserum. Im Vergleich mit dem Normalserum war jedoch diese Gamma-G-Globulin-Präzipitationslinie abgeschwächt und anodisch verkürzt. Eine Anomalie in ihrem Verlauf konnte nicht nachgewiesen werden. Nach Form und Lage in der Immunelektrophorese zu urteilen muß dieses Protein mit dem normalen Gamma-G-Anteil des Vollserums identisch sein. S_{20w} dieses auch sedimentationsanalytisch einheitlichen Proteins betrug 7 S.

Die Siderophilinzacke ist in diesem Chromatogramm kaum zu sehen. Sie war jedoch beim Auftragen größerer Serummengen in anderen Chromatogrammen noch einwandfrei nachweisbar. Die Albuminzacke ist ebenfalls im Vergleich zum Normalserum sehr klein.

Nach der Albuminzacke, also an einer Stelle, an der bei normalen Chromatogrammen nur geringe Mengen von Gamma-G- und $Alpha_2$-Proteinen nachweisbar sind, kommt eine große Zacke zur Darstellung. Dieses Bild war bei keinem der Normalseren und Gamma-G-Paraproteinen zu finden. Dieses Protein, enthalten in dieser Postalbuminzacke hat elektrophoretisch eine $Alpha_2$-Mobilität und ist im Vergleich zur Elektrophorese des Vollserums mit der Paraproteinfraktion identisch (Abb. 52). S_{20w} betrug ebenfalls 7 S.

Die Reinheit und Identität dieser Fraktion mit dem Paraprotein des Vollserums konnte durch die Immunelektrophorese, die modifizierte Immunelektrophorese nach Ossermann und den Ouchterlony-Doppeldiffusionstest gesichert werden.

5.6 Doppelparaproteinämien

Während das Auftreten einer schmalbasigen Sonderfraktion in der Elektrophorese bzw.eines Paraproteins in der Immunelektrophorese bei Erkrankungen des lymphoplasmoretikulären Systems eine häufige Erscheinung darstellt,ist das Vorkommen von zwei Paraproteinen ein sehr seltener Befund.Unter 1568 Paraproteinämien konnten wir nur in 6 Fällen den Befund einer Doppelparaproteinämie erheben; das würde einer Häufigkeit von o,4% entsprechen(56) Es bestanden folgende Kombinationen:

1 x IgAK + IgAL

1 x IgGK + IgAK

1 x IgGK + IgAL

2 x IgGK + IgGK

mit einwandfrei unterschiedlichen bzw. unterscheidbaren Gradienten sowie unterschiedlicher elektrophoretischer und immunelektrophoretischer Mobilität

1 x γ K

mit zwei elektrophoretisch einwandfrei unterscheidbaren Gradienten.Bei einem der Fälle (IgGK + IgAL) gelang uns die Trennung bzw.Isolierung beider Paraproteine durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose und anschließender Rechromatographie an einer Sephadex G 15o-Säule.Abb.39a zeigt das Chromatogramm gewonnen durch Gradientenelutionschromatographie an DEAE-Cellulose.Das IgG-Protein bzw.Paraprotein war in der ersten chromato=

graphischen Zacke (Frakt.I in Abb.39) in elektrophoretsich und immunelektrophoretisch reiner Form enthalten.Der 3.,4. und 5. chromatographische Peak enthielt neben IgA-Paraprotein Transferrin bzw.α_2-Makro-Globulin und ß-Lipoprotein noch Spuren von Albumin.Die Fraktionen 4 - 5 und 6 wurden zusammengenommen, eingeengt und auf einer Sephadex G-150-Säule rechromatographiert (Abb.39b).Entsprechend der Molekulargröße wurden hier zuerst das ß-Lipoprotein und das α_2-Makroglobulin (1.Peak in Abb.39b), dann das IgA-Globulin (2.Peak)eluiert.Der letzte chromatographische Peak enthielt Albumin und Transferrin.Abb.4o zeigt die Immunelektrophorese des isolierten IgG(unterhalb der Antikörperrille) und IgA(oberhalb der Antikörperrille) im Ansatz mit Kaninchenanti-Humanserum.Wie aus der Abbildung ersichtlich ist,ist jeweils nur eine Präzipitationslinie dargestellt.Die beiden isolierten Fraktionen zeigten im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest keine Antigenverwandschaft.

5.7 Serum von Patienten mit Dysproteinämie

Wir konnten bei den 9 von uns chromatographisch untersuchten Seren dieser Gruppe keinen Unterschied in der chromatographischen Verteilung der einzelnen Peaks gegenüber Normalseren finden. Auffallend war lediglich die starke Verkleinerung der Albuminzacke bei 2 Seren mit Dysproteinämie vom Gamma-Typ(Pat.Pi.und Pat.Gi.).Das Serumchromatogramm der Patientin Sch.ist in Abbildung 33 wiedergegeben.Bei dieser Patientin handelte es sich um ein metastasierendes Mammacarcinom mit starker Dysproteinämie gemischten Typs(Gesamteiweiß 5,37g%.Serumelektrophorese: Albumin 41,5rel%,Alpha$_1$lorel%,Alpha$_2$ 13,5 rel%,Beta 9,7 rel%, Gamma 25,3 rel%).

Ein wesentlicher Unterschied ist zwischen diesem Chromatogramm und dem Chromatogramm eines Normalserums nicht zu erkennen - außer einer Verkleinerung der Siderophilin-Zacke und die Erhöhung der Alpha$_2$-Zacke - das ist der Peak im Bereich der Fraktionen 102-106 in Abb.33.In der Albumin-Zacke sind außer Albumin noch Beta,Alpha$_1$- und Alpha$_2$-Globuline vertreten.Die alkalische Phosphatase-Aktivität,die bei dieser Patientin erhöht war, wurde hauptsächlich im Bereich der Elutionsfraktionen 44-63 und 103-105 mit 2 Gipfeln,einer davon in den Elutionsfraktionen 52-57 und einer bei 103-105 gefunden.

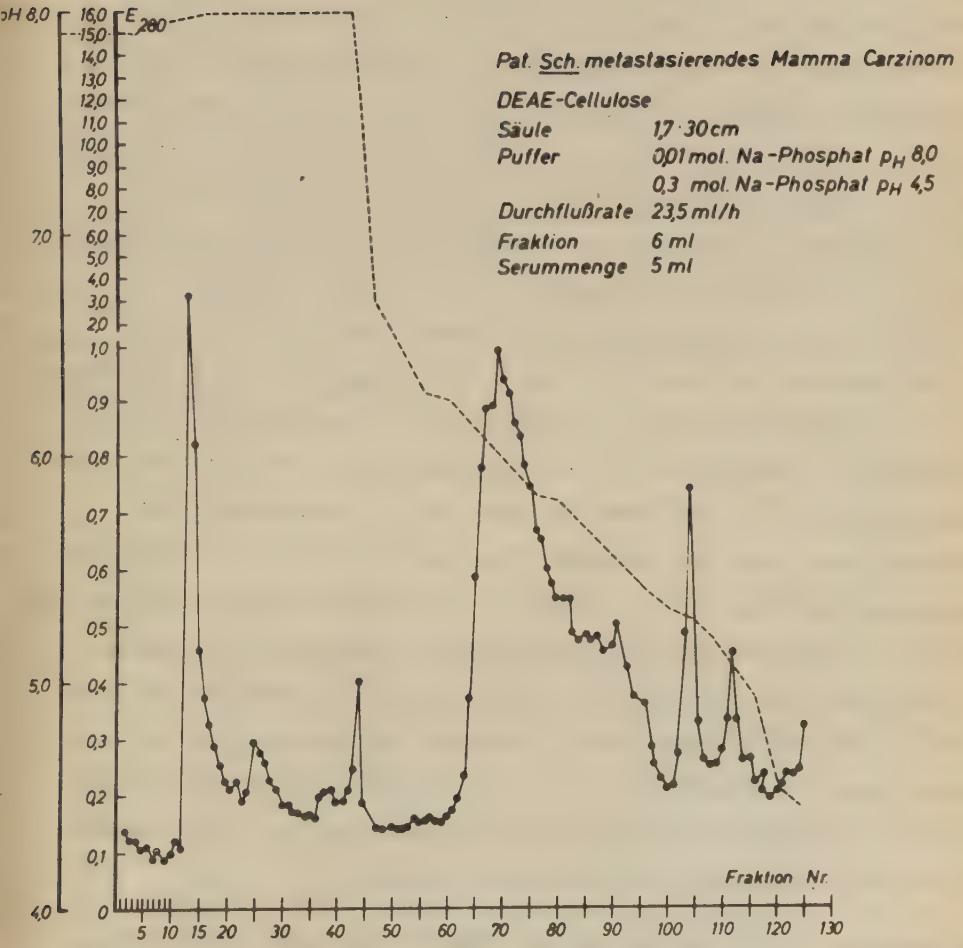


Abbildung 33

.8 Patienten mit Doppelalbuminämie

Unter dem Begriff Doppelalbuminämie (Bisalbuminämie, Dialbuminämie, Paralbuminämie) versteht man das Vorkommen von zwei elektrophoretisch unterschiedlich wandernden Komponenten in einem Serum (53,114). Dieses Phänomen wird als Ausdruck einer Gruppenspezifität - analog zum Transferrinsystem - definiert welche durch zwei autosomale Kodominanten Allele vererbt wird. Die Anomalie entspricht einem heterozygoten Zustand. Der Begriff Alloalbuminämie ist jedoch dem der Doppelalbuminämie überlegen und diesem vorzuziehen. Erstere umfasst nicht nur die heterozygoten Formen, die als Doppelalbuminämie in Erscheinung treten sondern auch die homozygoten, welche nur ein Albumin besitzt, das von den üblichen normalen Albuminen verschieden ist. Die Doppelalbuminämie ist somit nur ein Unterbegriff der Alloalbuminämie. Hinsichtlich der elektrophoretischen Mobilität der abnormalen Komponente unterscheidet man eine Alloalbuminämie vom schnellen und einen vom langsamen Typ; im ersteren Fall ist die Wanderungsgeschwindigkeit der abnormalen Albuminkomponente schneller, im letzteren langsamer als jene des normalen Albumins. Der langsame Typ scheint wesentlich häufiger vorzukommen. Die Anomalie ist - wie auch die übrigen Gruppensysteme - krankheitsunabhängig, worauf als erster Knedel hingewiesen hat (114). Aus zwei untersuchten Sippen konnten die Seren von 6 Fällen mit Doppelalbuminämie vom langsamen Typ säulenchromatographisch untersucht werden.

Zur Gewinnung bzw. Isolierung von Albumin wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt: a) präparative Kartonelektrophorese mit Kartonpapier als Trägermaterial; b) Fällung mit Trichloressigsäure im Verhältnis 1 : 1. Nach 2o Minuten zentrifugieren wird das Albumin mit 8o %igem Aceton aus dem Zentrifugat gelöst. Einengung im Vacuum. Rücklösung des getrockneten Albumins in o,9 %iger Kochsalzlösung unter Zugabe von einem Tropfen 1o %igem Ammoniak.

Die Trennung bzw. Isolierung der beiden Albumine erfolgte durch: Säulenchromatographie an Sephadex G-150-Säulen und anschließender Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose-Säulen. Das langsam wandernde abnormale Albumin wird zuerst, das schneller bzw. normal wandernde Albumin später eluiert. Abb. 34 zeigt die Serumelektrophorese (CAF) einer dieser Fälle im Vergleich zu einem Normalserum und Abb. 35 die CAF-Elektrophorese Gesamt-Albumin der Patienten mit Doppelalbuminämie im Vergleich zu den beiden isolierten Albuminfraktionen. Sedimentationsanalytisch haben beide Albumine dasselbe S_{20w} von 4,5. Durch eingehende immunologische Untersuchungen konnten keine antigenetische Differenzen zwischen den beiden Albuminen festgestellt werden.

Abbildung 34

Serumelektrophorese(CAF)der Patientin Eth.im Vergleich zu einem Normalserum.

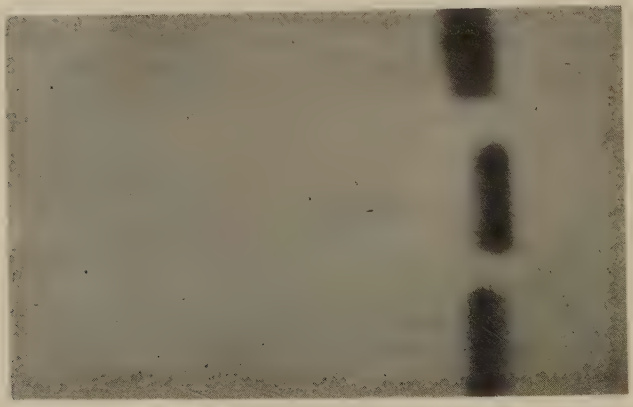


Abbildung 35

CAF-Elektrophorese des gefällten Albumins der Patientin Eth. im Vergleich zu den beiden chromatographisch isolierten Albuminfraktionen.

6 Diskussion

Die chromatographische Untersuchung der Proteine hatte anfänglich nicht den gleichen grossen Erfolg zu verzeichnen wie die mit anderen Stoffklassen und mikromolekularen Peptiden. Die leichte Denaturierbarkeit und die Grösse der Proteinmoleküle sind überwiegend für die anfänglichen Misserfolge verantwortlich zu machen. So wurden z.B. verschiedene Proteine an Harz denaturiert und irreversibel gebunden. Die Grösse der Proteinmoleküle verhinderte seine Penetration in die Teilchen der Ionenaustauscher, so dass nur die nach aussen gerichteten "Exogruppen" der Ionenaustauscher belegt werden konnten. Von entscheidender Bedeutung war die Erkenntnis, dass der Bereich der Bedingungen bzw. Milieuveränderungen - in Bezug auf pH und Salzkonzentration - unter welchen ein Proteinmolekül stabil bleibt und seine biologische Aktivität beibehält, sehr klein ist. So mußte also ein Austauscher gesucht werden, welcher für die makromolekularen Proteine eine viel größere Kapazität bot als die bis dahin bekannten Harze und darüberhinaus gestattete, die gebundenen Proteine unter physiologischen Bedingungen, ohne Verwendung von stärkeren Säuren oder Basen, wieder zu eluieren. Erst mit Einführung der substituierten Cellulose wurde ein Ionenaustauscher bekannt, der die oben genannten Voraussetzungen erfüllte und somit für die chromatographischen Untersuchungen der hochempfindlichen Proteine geeignet war. Die effektiv hohe Austauschkapazität der Cellulose-Austauscher für die makromolekularen Proteine

gegenüber den Kunstharzaustauschern trotz ihrer zahlenmässig kleineren Austauschkapazität, wird damit erklärt, dass die meisten austauschaktiven Gruppen der Cellulose-Austauscher, bedingt durch ihre Feinstruktur, nahe der Oberfläche liegen. Diese Austauscher haben somit für die Proteine eine sehr hohe, für die kleineren Elektrolyte jedoch eine geringe Kapazität, was für die Trennung der Serumproteine nur von Vorteil ist. Der Bereich der Bedingungen, unter welchen die absorptiven und desorptiven Vorgänge stattfinden können, ist bei diesem Austauscher sehr klein und für die Proteine relativ günstig. Bei richtiger Durchführung der Methode findet keine Denaturierung statt. Das Proteinmolekül besitzt nach seiner Trennung bzw. Isolierung seine gesamte immunologischen, elektrophoretischen und biologischen Eigenschaften und weicht in seiner Sedimentationskonstanten nicht von der des Ausgangsmaterials ab. So haben z.B. die rein dargestellten IgG-Globuline ihre gesamte Antikörperfunktion wie wir z.B. für die IgG-Globuline eines Pferdeantilymphocyten- und Pferdeantimenschenlymphocyten-Serums nachweisen konnten (55). Der geringe technische Aufwand und die leichte Durchführbarkeit sind weitere Vorteile dieser Methode und haben sie zu einem Routineverfahren in der Proteinchemie werden lassen. Wichtig ist die richtige Auswahl der Säule, des Elutionspuffers bzw. des Puffergradienten und das Verhältnis der Probelösung zur Austauschermenge. Das Elutionsmittel darf mit den Proteinen und Austauschern nicht reagieren und keinen Denaturierungseffekt ausüben. Es muss stabil und wasserlöslich sein. Bei richtiger Handhabung sind alle substitu-

ierten Cellulosen fast unbegrenzt haltbar und können nach Regenerieren wiederholt verwendet werden.
Durch alleinige Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose lassen sich von den normalen Serumproteinen lediglich die IgG in elektrophoretisch, immunologisch und sedimentationsanalytisch reiner Form gewinnen. Aus den beschriebenen Ergebnissen geht jedoch eindeutig hervor, daß diese nur ein Teil der IgG-Globuline sind, wenn auch der größte. Das IgG-Globulin ließ sich nämlich - außer im Bereich des dritten Gipfels - fast im gesamten Chromatogramm nachweisen. Daraus ist zu folgern, daß der größte Teil der IgG-Globuline säulenchromatographisch (an DEAE-Cellulose und Sephadex) einheitlich ist, daß es jedoch auch IgG-Moleküle gibt, welche diesbezüglich vom Gros der IgG-Globuline völlig abweichen, obwohl sie sich alle elektrophoretisch und sedimentationsanalytisch identisch verhalten. Dieses Verhalten wird besonders bei Paraproteinämien deutlich - worauf später eingegangen wird. Obwohl die Reihenfolge, in der verschiedene Serumproteine aus dem Celluloseionenaustauscher eluiert werden, in gewisser Beziehung zu ihrem isoelektrischen Punkt und somit zu ihrer elektrophoretischen Mobilität stehen, so zeigen jedoch die experimentellen Befunde, daß bei Ionenaustauschchromatographie auch andere Kräfte eine Rolle spielen müssen. Als Beispiel sei lediglich erwähnt, daß die Gamma-A, Gamma-M und Gamma-G-Globuline trotz ihrer nahezu gleichen elektrophoretischen Mobilität in völlig unterschiedlichen Regionen eluiert werden und gewisse $Alpha_1$- $Alpha_2$-Globuline - so z.B. das $Alpha_2$-Coeruloplasmin - viel später eluiert werden als die Albumine, obwohl sie geringere elektrophoretische Beweglichkeit besitzen als

letztere. Somit kann und muß das Verhalten der Proteine in der Säulenchromatographie als ein neues Charakteristikum derselben gewertet werden. Am Beispiel des IgG-Paraproteins mit elektrophoretischer $Alpha_2$-Mobilität wird dies besonders deutlich. Dieses Paraprotein ist immunologisch dem normalen IgG-Globulin nahe verwandt, besitzt die gleiche Sedimentationskonstante wie letzteres und hat eine $Alpha_2$-Mobilität. Bei der Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose wird dieses Paraprotein an völlig anderer Stelle eluiert als die normalen IgG; diese stellen die erste, jene die letzte chromatographische Zacke dar.
Das Albumin und verschiedene andere $Alpha_1$-$Alpha_2$-Globuline verlassen die Austauschersäule trotz ihrer größeren elektrophoretischen Mobilität viel früher als das IgG-Paraprotein mit $Alpha_2$-Beweglichkeit.
Wie schon erwähnt können mittels alleiniger Säulenchromatographie an Ionenaustauscher-Cellulose bzw. Sephadex nur wenige Proteine in reiner Form gewonnen werden. Die Methode stellt jedoch in Kombination mit verschiedenen anderen Verfahren, welche nach anderen Prinzipien arbeiten, einen sehr wichtigen Schritt zur Reinigung bzw. Isolierung zahlreicher Proteine und Enzyme dar.

Bei den durchgeführten Untersuchungen war beabsichtigt nach eingehenden methodischen Vorarbeiten, das Verhalten der verschiedenen Paraproteine bei der Ionenaustauscherchromatographie festzustellen und zu prüfen, in wie weit diese Methode für ihre Isolierung geeignet ist und ob es möglich ist ein Paraprotein von dem ihm nah verwandten Immunglobulin zu trennen.

Dabei konnte festgestellt werden, daß bei den Gamma-G-Paraproteinämien das pathologische Protein in überwiegender Mehrzahl der Fälle an derselben Stelle eluiert wird wie das normale IgG. Der Paraprotein-Peak fällt lediglich durch seine Höhe und meist seine Homogenität auf. Das immunelektrophoretische Bild des isolierten Paraproteins unterscheidet sich kaum von dem des Vollserums. Von insgesamt 37 Fällen von IgG-Paraproteinämien konnten bei 8 das IgG-Paraprotein vom normalen IgG getrennt und in elektrophoretisch, immunelektrophoretisch sowie sedimentationsanalytisch reiner Form gewonnen werden. Bei 2 dieser Fälle wies das Paraprotein eine $Alpha_2$-Mobilität auf und wurde wie schon erwähnt weit hinter dem Albumin aus der Austauschersäule eluiert. Dieser Befund konnte weder bei einer anderen Gamma-G-Paraproteinämie noch bei einer Dysproteinämie, welcher Genesis diese auch sein mochte, erhoben werden. Ob dabei der besonders hohe Kohlehydratanteil eine Rolle spielt, kann zur Zeit nicht beantwortet werden. Immunologisch zeigte dieses Paraprotein mit dem noch normalen Anteil des IgG-Proteins das Zeichen der Teilidentität. Bei 2 Fällen konnte die Trennung des pathologischen und normalen IgG-Globulins lediglich durch Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex erzielt werden, jedoch nicht an DEAE-Cellulose.

Das isolierte Paraprotein zeigte bei den genannten 8 Fällen in der Immunelektrophorese sowohl im Ansatz mit AHS als auch mit Anti-Gamma-G-Globulin-Serum nur eine pathologisch gebogene und verdichtete Linie. Eine zusätzliche Präzipitationslinie oder eine kathodische bzw. anodische Verlängerung wurde nie beobachtet, so daß diese beiden Phänomene im Vollserum auf die noch vorhandenen normalen Anteile des IgG-Globulins

zurückzuführen sind. Alle diese Paraproteine wurden an einer Stelle, wenn auch unter sich unterschiedlich, eluiert, an welcher normalerweise ein sehr geringer Anteil des IgG-Globulins vorkommt.

In der Gruppe der Gamma-A-Paraproteinämien ergab sich bei 17 der 20 untersuchten Seren das gleiche typische Elutionsmuster im Postalbumin-Bereich. Bei einem Fall erschien das Gamma-A-Paraprotein in einem breiten Abschnitt des Chromatogramms und zwar anfangend im Postsiderophilin-Bereich und endend mit der Albumin-Zacke. Bei 2 Fällen war das Paraprotein immer mit Albumin verunreinigt. In allen Fällen konnte das Paraprotein, wenn auch in Kombination mit anderen Methoden in elektrophoretisch und immunelektrophoretisch einheitlicher Form gewonnen werden.

In der Gruppe der Gamma-M-Paraproteinämien ergaben sich nahezu einheitliche Befunde. Die Elution der Paraproteine erfolgte stets am Ende des Chromatogramms, weit hinter dem Albumin-Bereich. Es ist möglich, daß diese Makroglobuline in dem ionenarmen Milieu ausfallen und erst mit dem Puffer höherer Ionenstärke eluiert werden. Mit DEAE-Sephadex-Säulen wurden besonders bei Gamma-M-Paraproteinämien eine bessere Trennung erzielt als mit DEAE-Cellulose-Säulen.

In einem Fall mit seltener Doppelparaproteinämie konnte das pathologische Gamma-A und Gamma-G-Globulin gut voneinander getrennt und isoliert werden.

Es zeigt sich also, daß es mit der kontinuierlichen Gradientenelutionschromatographie möglich ist, wenn auch in Kombination mit anderen Verfahren, die Paraproteine in elektrophoretisch, immunelektrophoretisch und sedimentationsanalytisch reiner Form zu gewinnen. In einigen Fällen gelingt sogar die Trennung

des normalen von dem pathologischen Gamma-G-Proteins. Uber diese präparativen Versuche hinaus stellt die Gradientenelutionschromatographie eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von Paraproteinen dar. Es konnte gezeigt werden, daß auch bei Fällen, die sich nach den bisherigen Untersuchungsmerkmalen nicht weiter differenzieren ließen, durch Säulenchromatographie abweichende Befunde erhoben werden konnten. Berücksichtigt man, daß für den Zeitpunkt der Elution eines Proteins bzw. Paraproteins bei diesen Verfahren die Wechselbeziehungen zwischen Austauschermaterial, Charakteristik des Puffergradienten und Struktur des Proteins maßgebend sind und verändert bei vergleichenden Untersuchungen (insbesondere mit der Doppelsäulentechnik) die beiden ersten Bedingungen nicht, so kann aus dem Auftreten eines Paraproteins an atypischer Stelle im Chromatogramm ein Rückschluss auf Strukturunterschiede gezogen werden.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird nach einer kurzen Darstellung verschiedener säulenchromatographischer Verfahren speziell auf die Gradientenelutionschromatographie an Ionenaustauschern eingegangen und über die säulenchromatographischen Untersuchungen von paraproteinämischen und dysproteinämischen Seren berichtet.

Bei den Normalseren (n=30) ergab sich stets das gleiche Bild, wobei die gewonnenen Proteinfraktionen bzw. die chromatographischen Peaks, entsprechend der üblichen Schwankungsbreite der Serumproteine im Normalserum anteilmäßig variierten. Als erste Eiweißfraktion wird das IgG-Globulin als scharfer und symetrischer Peak eluiert. Die präparative Gewinnung der IgG-Globuline ist daher gut möglich. Der zweite große Peak enthält hauptsächlich Transferrin, der dritte überwiegend Albumin. Insgesamt wurden 37 IgG-Paraproteinämie-Seren untersucht. 2 dieser Paraproteine wiesen eine Alpha$_2$-Beweglichkeit auf. Das Elutionsmuster, gewonnen mit der DEAE-Cellulose-Säule, zeichnete sich in 29 Fällen, gegenüber den Chromatogrammen der Normalseren, nur durch einen sehr hohen und schmalen 1. Peak (IgG-Peak) aus. Bei 8 Fällen wurde das IgG-Paraprotein getrennt vom Gros der normalen IgG-Globuline an einer Stelle eluiert, an der bei Normalseren nur nach starker Konzentrierung der gewonnenen Fraktionen Spuren von IgG nachweisbar waren. Die Trennung der Paraproteine vom Hauptanteil der normalen IgG war bei 2 weiteren Fällen durch Verwendung von DEAE-Sephadex anstelle von DEAE-Cellulose möglich. Alle isolierten Fraktionen wurden eingehend elektrophoretisch, Immunelektrophoretisch und sedimentationsanalytisch untersucht.

In der Gruppe der IgA-Paraproteinämien ergab sich bei 17 Seren das gleiche Elutionsdiagramm mit Auftreten des IgA-Paraproteins im Postalbuminbereich. In diesem Bereich wird auch das normale IgA-Globulin eluiert. Bei den übrigen Fällen war ein hoher und breiter Peak im Posttransferrin- und im Albumin-Bereich nachweisbar. In allen Fällen konnte das IgA-Paraprotein durch Anwendung zusätzlicher Methoden (Kartonelektrophorese, Rechromatographie) in elektrophoretisch und immunelektrophoretisch reiner Form gewonnen werden.

Bei den IgM-Paraproteinämien (n=14) ergab sich stets ein typisches Muster mit Auftreten eines abnormen Peaks am Ende des Chromatogramms. Mit DEAE-Sephadex-Säulen war im allgemeinen eine bessere Trennung zu erzielen als mit DEAE-Cellulose-Säulen.

Wir konnten bei den untersuchten 9 dysproteinämischen Seren keinen Unterschied in der chromatographischen Verteilung der einzelnen Peaks gegenüber den Normalseren finden.

Die erhobenen Befunde zeigen, daß die Methode der kontinuierlichen Gradientenelutionschromatographie sehr oft allein zur Gewinnung von Paraproteinen führt, zumindest aber als entscheidender Schritt bei der praparativen Gewinnung von Paraproteinen im Rahmen mehrstufiger Verfahren eingesetzt werden kann. Über diese Möglichkeit hinaus ergibt sich, daß mit Hilfe der Gradientenelutionschromatographie eine neue Charakteresierung der Paraproteine möglich ist.

8. LITERATUR

1. ADAMS,B.A. u. E.L.HOLMES : a) J.Soc.chem.Ind.(London) 54,1 T(1935)
   b) EP 450,308/9 (1934)
   c) Chem.Age 38,117 (1938)

2. ALM,R.S. : Acta Chem.Scand. 6,1186(1952)

3. ALM,R.S.,R.J.P.WILLIAMS,A.TISELIUS : Acta Chem.Scand 6,826(1952)

4. ANGELETTI,P.,B.MOORE,V.SUNTREFF,R.GAYLE : Proc.Soc.Exp.Biol.108,53(1961)

5. ANT-WUORINEN,O.,VISAPAA : State Inst.Tech.Research Finland,Rept.135(1954)

6. ARISTOTELES : Werke 7,9356 ca 330 v.Chr.

7. ASTWOOD,E.B.,M.S.RABEN,R.W.PAYNE,A.B.GRADY : J.Am.Chem.Soc., 73,2969(1951)

8. BANNISTER,D.W.,C.S.G.PHILLIPS,R.I.P.WILLIAMS : Analyt.Chem. 26,1451 (1954)

9. BECKER-BOST,E.H. :Encyklopädie der techn.Chemie, 3.Auflage,Band 8 München,823 (1957)

10. BENDICH,A.,H.B.PAHL,G.KORNGOLD,H.S.ROSENKRANZ,J.R.FRESCO : J.Am.Chem.Soc., 80,3949(1958)

11. BENDICH,A.,J.R.FRESCO,H.S.ROSENKRANZ,S.M.BEISER : J.Am.Chem.Soc., 77,2671(1955)

12. BENNETT,A.E. : Nucleonics 10,14(1952)

13. BOARDMAN,N.K.,S.M.PATRIDGE : Nature 171,208 (1953)

14. BOCK,R.M.,N.S.LING :Analyt.Chem. 26,1543(1954)

15. BOELHOUWER,C.,A.I.Van RIEMSDIJK,J.Van STEENICS,H.I.WATERMAN: Anal.Chim.Acta 6,476(1952)

16. BOMAN,H.G.: Nature 175,898(1955)

17. BRADLEY,D.F.,A.RICH : J.Am.Chem.Soc. 78,5898 (1958)

18. BRANDENBERGER,H.:Helv.Chim.Acta 37,97(1954)

19. BRIMLEY,R.C.,F.C.BARRETT:
Practical Chromatography Chapman a.Hall,London 1953

20. CAMPBELL,D.H.,E.LÜSCHER,L.S.LERMAN :
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 37,575(1951)

21. CARLANDER,A.Th.,S.GARDELL :
Arkiv Kemi 4,461(1952)

22. CHERRIN,A.,F.E.MARTINEZ,M.S.DUNN :
J.Am.Chem.Soc.75,1244(1953)

23. CREASER,E.M.,A.TAUSSIG :
Virologiy 4,200(1957)

24. COHEN,S :Biochem.J. 89,334(1963)

25. COHEN,S.,T.REEMAN :
Biochem.J. 76,475(1961)

26. COHEN,S,T.FREEMAN :Biochem.J. 76,475(1960)

27. COMMONER,B.,J.A.LIPPINCOTT,G.B.SHEARER,E.E.RICHMAN,J.H.WU :
Nature, 178,767(1956)

28. CONSDEN,R.,A.H.GORDON,A.I.P.MARTIN :
Biochem.J. 38,224(1944)

29. COOKE,K.R.,M.P.TOMBS,R.D.WESTON,F.SAUTER,N.F.MAGLAGAN :
Clin.Chim.Acta 4,779(1959)

30. CUKOW,F.W.,R.J.C.HARRIS,F.E.SPEED :
J.Soc.Chem.Ind. 68,208(1949)

31. CURZON,G.,L.VALLET :
Biochem.J. 74,279(1960)

32. CYR,Ch.,St.DE VAUX,G.HERMAN :
Dtsch.Gesell.f.Med.1962

33. DAUL,G.C.,J.D.REID,R.M.REINHARD :
Ind.Eng.Chem. 46,1042(1954)

34. DAVIDSON,G.F. :J.Textile Inst. 41 T,316(1950)

35. DEICHER,H. :Klin.wschr. 42,370(1964)

36. DEICHER,H.: Klin.Wschr. 42,313(1964)

37. DEUTSCH,H.F.:Science 141,435(1963)

38. DEUTSCH,H.F.:Clin.Chim.Acta:5,460(1960)

39. DEUTSCH,H.F.,C.B.KASPER,D.A.WAISH :
Arch.Biochem.Biophys. 99,132(1962)

40. DEUTSCH,H.F.,E.R.STIEHM,J.I.MORTON :
J.Biol.Chem.236,2216 (1961)

41. DONALDSON,K.O.,V.J.TULANC,I.M.MARSHALL :
Analyt.Chem. 24,185(1952)

42. DRAKE,B. :Ark.Kemi 8,1(1955)

43. DUSTIN,J.P. :Industrie,chim.Belge 17,257(1952)

44. DUTTON,H.J.,F.J.CASTLE :
Anal.Chem. 25,1427(1953)

45. EDELMAN,G.M.,J.F.HEREMANS,M.Th.HEREMANS,H.G.KUNKEL :
J.Exp.Med. 112,203(1960)

46. ELLIS,S.,M.E.SIMPSON :
J.Biol.Chem. 220,939(1956)

47. FAHEY,J.L. :J.of Immunol. 91,438(1963)

48. FAHEY,J.L.:J.Biol.Chem. 237,440(1962)

49. FAHEY,J.L. :J.Clin.Invest. 42,111(1963)

50. FAHEY,J.L.,A.P.HORBUT :
J.Biol.Chem. 234,2645(1959)

51. FAHEY,J.L.,P.F.MC.COY,M.GOULIAN :
J.Clin.Invest. 37,272(1958)

52. FAHEY,J.L.,H.C.GOODMAN :
J.Clin.Invest. 39,1259(1960)

53. FATEH'MOGHADAM,A,J.EISENBURG,R.LAMERZ
Klin.Wschr.47,976(1969)

54. FATEH'MOGHADAM,A,M.KNEDEL :
Verhlg.Dtsch.Ges.f.Int.Med. 69,444(1963)

55. FATEH'MOGHADAM,A,R.PICHLMAYER,H.W.JARCSCH von SCHWEDER,M.
KNEDEL :
Klin.Wschr. 45,578(1967)

56. FATEH'MOGHADAM,A.,H.WÜRZ,R.M.OESER,M.KNEDEL :
Dtsch.Med.Wschr. 36,1695(1968)

57. FISCHER,E.,T.WIELAND :
Chem.Ing.Tech. 22,485(1950)

58. FITCH,F.T.,D.S.RUSSEL :
Anal.Chem. 23,1469 (1951)

59. FLODIN,P :Dextran Gels and their Application in Gel Filtration,Uppsala 1962

6o. FRANKLIN,E.C. :J.Clin.Invest. 39,989(196o)

61. FRANKLIN,F.C.,F.J.PRELLI:J.Clin.Invest.39,1933(196o)

62. FRANKLIN,F.C.,R.DENIS,STANWORTH :
J.Exp.Med.114,521(1961)

63. FRANCHIMONT,A.P.N. :Ber.dtsch.chem.Ges. 12,1879(1938)

64. FREILIN,E.C. :J.Am.Chem.Soc. 77,2o67(1955)

65. FREILIN,E.C. :J.Phys.Chem. 61,543(1957)

66. FORD,F.M.,W.F.HALL :
U.S.Pat. 2,482,755(1949)

67. GANS,R. :Jahrb.Kgl.preuss.geol.Landesanstalt
26,179(19o5),27,63(19o6)

68. GANS,R. :Chem.Ind. 32,197 (19o9)

69. GEIß,E. :Hop.Seyl.Ztschr.phys.Chem. 3o8,74(1957)

7o. GLOWSET,J. :Acta Chem.Scand., 12,641(1958)

71. GLUECKAUF,E. :Ion Exchange and Applications,
Soc.Chem.Ind.London 34(1955)

72. GODAL,H.C.,E.F.LÜSCHER :
J.Clin.Lab.Invest. 12,47(196o)

73. GOPPELSROEDER,F. :Kapillaranalyse,Basel 19o1

74. GRABAR,P.,C.A.WILLIAMS :
Biochim.Biophys.Acta(amst.) 1o,193(1953)

75. GRASS,D.,W.V.EPSTEIN :
J.clin.Invest. 43,83(1964)

76. GRASSMANN,W.,HANNIG,K.,M.KNEDEL :
Dtsch.Med.Wschr. 76,333(1951)

77. GRASSMANN,W.,K.HANNIG :
Naturwiss. 37,496,(195o)

78. GREENE,C.H.,L.S.DELALLA,V,N.TOMPKINS :
Proc.Soc.Exp.Biol. 1o5(196o)

79. GRIESSBACH,R. : Angew.Chem 52,215(1939)

8o. GSCHWIND,J.J.und Mitarbeiter :
Am.Soc. 74,2121(1952)

81. GUTHRIE,J.D. : Chance,L.H.,C.L.HOFFPANIR :
US Pat. 2,618, 846(1954)

82. GUTRIE,J.D.:Ion Exchanger in Organic and Biochemistry
Calvin Calmon und T.R.Kressmann Edition 1957

83. GUTHRIE,J.D. :Ind.Engl.Chem. 44,2187(1952)

84. HAHN,J.W.,M.NYMAN :
Anal.Chem. 27,330(1955)

85. HALE,D.K. : Ion Exchangers in Organic and Biochem.in Calvin
Calmon u.TR. E.Kressmann.The Permutet a.Co Ltd.,London
Editors 1957

86. HAMILTON,P.B. :Anal.Chem. 26,1857(1954)

87. HANSON,L.A,B.G.JOHANSSON :
Int.Arch.Allergy 2o,65(1962)

88. HAREMANN,K.: Klin.Wschr. 42,866(1964)

89. HARMS u.RÜMPLER,A :V.Intern.Kongr.f.angew.Chemie 59(1903)

9o. HARRISON,J. : Soc.Dyers a.Col., 28,359(1912)

91. HARTMANN,M.:Unites States Patent 1,777,97o(193o),Swiss
Patent 141,556(193o),French Patent 68o,956(193o)

92. HAWORTH,W.N. :Helv.Chim.Acta 11,534(1928)

93. HEDBUG,H.,U.MORITZ :
Act.Rheum.Scand. 6,179(196o)

94. HELFFERICH,F. :Ionenaustaushcer Band 1,Verlag Chemie 1959

95. HEHRE,E.I.,A.S.CARLSON :
Arch.Bioch.Biophys. 36,158 (1952)

96. HENNEBERG,W.,F.STOHMANN :
Am.Chem.Pharm. 1o7,152(1958)

97. HENRY,R.,M.THERCENET :
Bull.Soc.chim.biol. 34,839(1952)

98. HERMANN,G,C.H.CYR,St.DE VAUX :
Dtsch.Ges.f.inn.Med.1962

99. HINZ,C.F.J.T.BOYER :
New Eng.J.of Med. 269,1329(1963)

loo. HIRS,C.H.W.,W.H.STEIN,S.MOORE :
J.Amer.Chem.Soc.73,1893(1951)

101. HOFFMANN,C.L.,J.D.GUTHRIE :
Textile Research j.2o,617(195o)

102. HOLMBERG,C.G.,L.E.WESTLUND :
Proc.of the Biol.Fluids 8o(1959)

103. HUMPHREY,J.H.,R.R.PORTER :
Lancet 26,196(1957)

104. HURST,R.O.,G.C.BUTLER :
J.Biol.Chem.193,91(1951)

105. HURST,R.C.,G.C.BUTLER :
J.BiolChem. 193,91 (1951)

106. JAKUBOVIC,A.o. Nature 184,1065(1959)

107. JAKUBOVIC,A.O.,C.S.Knight :
Chromatogr.Techniques

108. JAMES,E. :
Fed.Proc. Vol.22 No 2

109. JAMES,A.T.,A.J.P.MARTIN,S.S.RANDALL :
Bioch.J. 49,293(1951)

11o. KARLSON,P. :Kurzes Lehrbuch d.Biochem,Georg Thieme Verlag,
Stuttgart,1961

111. KELLER,S.,R.J.BLOCK :
Arch.Bioch.Biophys. 85,366(1959)

112. KELLER,S.,R.J.BLOCK :
Contrib.f.Boyce Thompson Institute 19,451(1958)

113. KENYON,W.O. und MITARBEITER :
J.Am.Chem.Soc. 69,355(1947)

114. KNEDEL,M. : Blut, 3,129(1957)

115. KNEDEL,M. : Clin.Chim.Acta 3,71(1958)

116. KNEDEL,M. : Plasma 1,87(1953)

117. KNEDEL,M.

118. KNEDEL,M.,A.FATEH'MOGHADAM :
Erb.Lab.Med. 2,137(1965)

119. KNEDEL,M,A.FATEH-MOGHADAM :
"G-I-T" Oktober 1965

120. KNEDEL,M.,A.FATEH-MOGHADAM :
Klin.Wschr. 46,1078(1968)

121. KNEDEL,M.,F.SPERL :
Blut V. 2,66(1959)

122. KUHN,R.,E.LEDERER :
Berl.dtsch.Ges.f.Chem. 64,1349(1931)

123. LAUER,K.,R.DÖDERLEIN,C.JACKEL,O.WILDE :
J.Makromol.Chem. 1,46(1943)

124. LAWRENCE,S.H.,D.C.BENJAMIN :
Clin.Chim.Acta 6,398(1961)

125. LAWSON,G.I.,J.W.PURDIE :
Mikrochem.Acta(wien) 415(1961)

126. LEMBERG,J. :Z.dtsch.geol.Ges. 22,355(1870)u.28,519(1876)

127. LERMAN,L.S. :Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 39,232(1953)

128. LEWY,H.B.,H.A.SOBER :
Soc.Exp.Biol.Med. 103,250(1960)

129. LIEBLÄNDER,M :Hop.Seyl.Ztschr.f.phys.Chem.335,125(1964)

130. LIEBLÄNDER,M.,H.STEGEMANN:
Hop.Seyl.Ztschr.f.phys.Chem. 325,204(1961)

131. LOSPALLUTO,I.,I.CHEGARIANSKY,A.LEWIS,Z.MORRIS :
J.Clin.Invest. 39,473(1960)

132. MADER,C. :Anal.Chem. 26,566(1954)

133. MADER,C.,G.MADER :
Anal.Chem. 25,1423,1556 (1953)

134. MANDELES,S. :J.Chromatogr. 3,256(1960)

135. MARR,A.G.,C.M.Gilbo :
Nature 185,853(1960)

136. MARTIN,A.J.P. :Ann.Rev.Biochem. 19,520(1950)

137. MARTIN,A.J.P.,A.H.GORDON,R.L.M.SYNGE :
Bioch.J. 35, 91 und 1358(1941)

138. MAURER,K.,H.G.REIFF :
J.macrom.Chem. 1,27(1943)

139. MELVIN,F.,F.W.PUTNAM :
J.Biol.Chem.235,3472(1960)

140. MEYER,K.H.,L.MICH :
Helv.Chim.Acta 2o,252(1937)

141. MICHAELIS,L. : Bioch.Z. 254,159(1931)

142. MITCHEL,H.K.,M.GORDON,F.A.HASKINS :
J.Biol.Chem. 18o,1o71(1949)

143. MOORE,S.,W.H.STEIN :
Adv.in Prot.Chem. 11,191(1956)

144. MOORE,S.,H.W.STEIN :
J.Biol.Chem. 178,53(1949)

145. MOORE,S.,H.W.STEIN :
J.Biol.Chem. 192,663(1951)

146. MOORE,B.W.,R.H.LEE :
J.Biol.Chem. 235,1359(196o)

147. MORGAN,W.S.,T.HULTIN :
Bioch.Biophys.Acta 47,19o(19€1)

148. MOSES :Altes Testament,2.Buch 15/23-25

149. OSSERMANN,E.F. :J.of Immun. 84,92(196o)

15o. OSTROWSKI,W.,A.TSUGITA :
Arch.Biochem.Biophys. 94,68(1961)

151. OUCHTERLONY,O. :Acta Pathol.Microbuiol.Scand. 25,186(1948)

152. PARTRIDGE,S.M.,G.WESTALL :
Bioch.J. 44,418(1949)

153. PETERSON,E.A.,H.A.SOBER :
Feder.Proc. 13,273(1954)

154. PETERSON,E.A.,H.A.SOBER :J.Am.Chem.Soc. 78,751(1956)

155. PETERSON,E.A.,M.M.WYKOFF,H.A.SOBER :
Arch.Bioch.Biophys. 93,428(1961)

156. PETERSON,E.A.,H.A.SOBER :
Anal.Chem. 31,857(1959)

157. PHILLIPS,D.M.P. :Nature Lond. 164,545(1949)

158. PIERCE,J.G.,L.K.WYNSTON,M.C.CARSTEN :
Biochim.Biophys.Acta 28,434(1958)

159. PIEZ,K.A. : Analyt.Chem. 28,1451(1956)

160. PORATH,J.,H.BENNICH :
Arch.Bioch.Biophys.Suppl.1. 152(1962)

161. PORATH,J.,E.B.LINDNER,S.JERSTEDT :
Nature 182,744(1958)

162. PORATH,J. :Ark.Kemi 11,97(1956)

163. PORTER,H.,M.SWEENEY,E.M.PORTER :
Arch.Bioch.Biophys.105,319(1964)

164. PORTER,H.,M.SWEENEY,E.M.PORTER :
Arch.Bioch.Biophys. 105,319(1964)

165. PORTER,R.R. :Bioch.J. 73,119(1959)

166. PRAGER,M.D.,R.J.SPEER,J.WILLIAMS,M.GOERNER :
J.Lab.Clin.Med. 54,5(1959)

167. PRAGER,M.D.,I.C.ATKINS :
J.Lab.Clin.Med. 58,278(1961)

168. PRESS,E.M.,R.R.PORTER,I.CEBRA :
Bioch.J. 74,501(1960)

169. RANDERATH,K. :Dünnschichtchromatograph.Verlag Chemie
Weinheim S.34 35, 193(1962)

170. RANDERATH,K. :Bioch.Biophys.Acta 61,852(1963)

171. RANDERATH,K.,E.RANDERATH :
J.Chrom. 10,509(1963)

172. RANDERATH,K:Bioch.Biophys.Acta 76,129(1963) u.622(1963)

173. REID,W.W. :Nature 166,569(1950)

174. REITH,A.,I.MÖHR,E.SCHMIDT,F.W.SCHMIDT,E.WILDHIRT :
Klin.Wschr. 42,909(1964)

175. REITH,E.,F.W.SCHMIDT :
Klin.Wschr. 42,915(1964)

176. RIGGS,I.L.,P.C.LOH,W.C.EVELAND :
Proc.Soc.f.Exp.Biol.Med. 105,655(1960)

177. ROBBINS,J.:Compt.rend.trav.lab.,Carlsberg 32,215(1961)

178. ROBBINS,J : J.Biol.Chem. 238,182(1963)

179. RUNGE,F. : Dissertation Berlin,1822

180. RUNGE,F.: Zur Farbenchemie,Musterbilder f.Freunde des Schönen und Gebrauch f.Maler 1850 Berlin

181. RUNGE,F. :Der Bildungstrieb der Stoffe,Oranienburg 1855

182. RYBÁK,M.,M.PETÁKOVÁ,E.SIMONIANOVA : Ztschr.f.Imm.-u.Allerg. 125,351(1963)

183. SAMUELSON,O.:Svensk Kem.Tidskr. 53,422(1941)

184. SAMUELSON,O.:Svensk Kem.Tidskr. 58,247(1946)

185. SAMUELSON,O.:Ion Exchangers in Analyt.Chemistr.,John Willy a.Sons,New York(1953),117,136,196

186. SANDERSON,E.S. : Anal.Chem. 26,944(1954)

187. SANGER,F. :Biochem.J. 38,285(1944)

188. SANGER,F. :Bioch.J. 40,261(1946)

189. SANGER,F.:Bioch.J. 37, 92 (1943)

190. SANGER,F. :Bioch.J. 39,507(1945)

191. SANGER,F.,H.TUPPY : Bioch.J. 49,463 (1951)

192. SCHEIDEGGER,I.I.:Int.Arch.Allerg. 7,103(1955)

193. SCHMIDT,E.,Y.C.YANG,W.JANDEBEUR : Cellulosechemie 12,201(1931)

194. SCHMIDT,E.,Y.C.YANG,W.JANDEBEUR : Cellulosechemie 13,129(1932)

195. SCHMIDT,E.,R.SCHNEGG,M.HECKER: Naturwiss., 21,206(1933)

196. SCHMIDT,E.:Naturwiss. 19,1006(1931)

197. SCHMIDT,E.: Ber.dtsch.chem.Ges. 67,2037(1934)

198. SCHÖNLEIN,C.F.:Am.Phys. 114,275 (1861)

199. SCHROEDER,W.H.,R.B.COREY :Analt.Chem. 23,1723(1951)

200. SCHWAB,H.,W.RIEMAN,P.A.VAUGHAN : Analyt.Chem. 29,1357(1957)

201. SEAL,U.S.,R.P.DOE : Cancer Chemoth.Reports 16,529(1962)

202. SEAL,U.S.,R.P.DOE :
J.Biol.Chem. 237,3136 (1962)

203. SEMENZA,G. :Helv.Chim.Acta 43,1057(1960)

204. SEMENZA ,G.,L.S.PRESTIDGE,D.MENARD'JECKER,D.,BETTEX-GALLAND,M
Helv.Chim.Acta 42,669(1959)

205. SHULMAN,S.,ARMENIA,J. :
J.Biol.Chem. 238,2723(1963)

206. SIMMONDS,D.H.,K.J.WOOD :
Anal.Chem. 26,1860(1954)

207. SKRAUP,Z.H. : M.Chem. 26,1415(1905)

208. SMITH,L.F.:Bioch.Biophys.Acta 82,231(1964)

209. SOBER,H.A.,E.A.PETERSON :
Calmon a. T.Re.Kressmann,New York,Interscience,318(1957)

210. SOBER,H.A.,J.F.GUTTER,M.M.WYKOFF,E.A.PETERSON :
J.Am.Chem.Soc. 78,756(1956)

211. SOBER,H.A.,G.KEGELES,J.F.GUTTER :
J.Am.Chem.Soc.74,2734(1952)

212. SOBER,H.A.,G.KEGELES,J.F.GUTTER:
Science 110,564(1949)

213. SOBER,H.A.,E.A.PETERSON :
Abstracts 126 th National Meeting Am.Chem.Soc.90 C Sept.1954

214. SOBER,H.A.,E.A.PETERSON :
Fed.Proc. 17,1116(1958)

215. SOBER,H.A.,E.A.PETERSON :
J.Am.Chem.Soc. 76,1711(1954)

216. SPEER,R.J.,J.PRAGER :
Lab.Clin.Med. 54,685(1959)

217. STANLEY,P.G. :Bioch.Biophys.Acta 78,756(1963)

218. STEIN,W.H.,St.MOORE :
J.Biol.Chem. 176,337(1948)

219. STUDER,M. :Dissert.Genf(1946)

220. SWINGLE,S.M.,A.TISELIUS :
Biochem.J. 48,171(1951)

221. TALLAN,H.H.,STEIN,W.H. :J.Amer.Chem.Soc.73,2976(1951)

222. TAUBER,H. : J.Biol.Chem.113,753(1936)

223. THOMPSON,H.S. : J.Roy.Agr.Soc.Engl. 11,68(1850)

224. TIMELL :Svensk Popperstidn 51,254(1948)

225. TISELIUS,A.,S.HJERTEN,Ö.LEVIN :
Arch.Biochem.Biophys.65,132(1956)

226. TISELIUS,A. :Ark.kem.Mineral.Geol.Ser.B. 14,22(1940)

227. TOMBS,M.P.,D.C.O.JAMES,N.F.MAGLAGAN :
Clin.Chim.Acta 6,163(1960)

228. TOMBS,M.P.,K.B.COOKE,D.BURSTON,N.F.MACLAGAN :
Biochem.J. 80,284(1961)

229. TSETT,M.:Berl.dtsch.Chem.Ges. 24,316(1906)

230. TURBA,F.:Chrom.Methoden in d.Proteinchemie,Springer-Verlag 1954)

231. TURBA,F.,H.FASOLD,G.GUNDLACH :
Ztschr.f.anal.Chem. 201,87(1964)

232. TURBA,F.:Berl.dtsch.chem.Ges. 74,1829(1941)

233. UNRUH,C.C.,W.O.KENYON :
J.Am.Chem.Soc. 64,127(1942)

234. URBAIN,O.M.,W.R.STEMEN :
U.S.Pat. 2,265,585(1941)

235. VAN DER WYK,A.I.,M.VAN DER STUDER :
Helv.Chim.Acta 32,1698 (1949)

236. VON DER DECKEN,T.HULTIN :
Bioch.Biophys.Acta 40,189(1960)

237. WAY,J.T. :J.Roy.Agr.Soc.Engl. 11,313(1850) u.13,123(1852)

238. WESTERGRAD,P. : J.Chrom.(Amsterdam) 3,560(1960)

239. WIEDERMANN,D.,Z.BRADA,Z.CHURY,A.KUBIKOWA :
Schweiz.Med.Wschr. 93,1415(1963)

240. WIEDERMANN,D. :Science 131,500(1960)

241. WIEDERMANN,D.,BRADA,Z.,Z,CHURY,A.KUBIKOWA :
Schweiz.Med.Wschr. 40,1415(1963)

242. WIELAND,T.,A.BERG :
Angw.Chem. 64,418(1952)

243. WYNSTON,L.K.,C.A.H.FREE,J.G.PIERCE :
J.Biol.Chem.235,85(1960)

244. E.C.YACKEL,W.O.KENYON :
J.Am.Chem.Soc. 64,121(1942)

245. YOKOYAMA,M.,I.S.FINLEYSON,R.T.SUCHINSKY,N.E.ROBERTS :
J.Immunology 87,50(1961)

246. ZEILER,K. : Dissert. München 1967

247. ZITTLE,C.A. :Advances in Enzymol. 14,319(1953)

Verwendetes System	Untersuchungs-material	Erreichtes Ziel	Literatur
Gradientenelution Glycinpuffer 0,005 m und 0,1 m pH 9,5	Thyreotropin	Reinigung und Konzentrierung	158 243
Schrittweise Elution 0,018 m pH 6,7 0,04 m pH 5,9 0,10 m pH 5,8 0,4 m Na-phosphatpuffer	Corticosteroid-binding-globulin	Reinigung und Darstellung	201 202
Anfangspuffer 0,05 m Acetatpuffer pH 5,5 nachdem das blaue Band von d.1.Hälfte 2/3 der Säulenlänge erreicht hat, Elution mit 0,5 m NaCl	Coeruloplasmin	Trennung	38
Gradientenelution: Glycin 0,01 m pH 9,0 II. 0,02 m pH 8,5 III. 0,04 m pH 8,0 IV. 0,06 m pH 7,5 V. 0,08 m pH 7,0 VI. 0,10 m pH 6,0 VII. 0,30 m pH 6,0 VIII. 0,50 m pH 5,5 IX. 1,00 m pH 4,5	Kälteagglutinine	Kälteagglutinine waren in einer einzigen Region d. Chromatogramms. Korreliert mit 19 S-Gammaglobulin	167
Parabolischer Gradient mit Grenzkonzentration von 1 m NaCl Prostatagewebe wurde homogenisiert in 0,005 m Trisphosphatpuffer pH 8 und zentrifugiert. Der Überstand sowie das Serum wurden gegen Anfangspuffer dialysiert.	Saure Phosphatase im NS und im Prostatagewebe	2 Komponenten von aktivem Enzym konnten getrennt werden, mit gleicher chromatographischer Eigenschaft wie das im Prostatagewebe vorkommende Enzym	4 146

Tabelle 2

Gradientenelution mit 2-Kammer-Systemen Anfangspuffer:Na-phosphatpuffer 0,01 m Grenzpuffer:Na-phosphatpuffer 0,3 m	Saure Serumphosphatase	Chromatographische Trennung von saurer Serumphosphatase bei Patienten mit metastasierendem Prostatacarcinom	51
	Saure Phosphatase	Reinigung von saurer Phosphomonoesterase aus menschlichem Prostatagewebe	150
Gradientenelution mit 2-Kammer-System Anfangspuffer: 0,01 m Na-phosphatpuffer Grenzpuffer: 0,3 m Na-phosphatpuffer	Alkalische Phosphatase	Trennung in 2 chromatographische " Peaks "	51
Schrittweise Elution mit 0,1 m NaCl und 0,01 m $NaPO_4$, 0,15 m NaCl und 0,01 m $NaPO_4$, 0,5 m NaCl und 0,05 m $NaPO_4$	Thyreoglobulin	Fraktionierung von Rinderthyreoglobulin in 3 Fraktionen	
Gradientenelution mit I. 0,02m Tham-HCl+ 0,05 NaCl II. 0,02m Tham-HCl + 0,125 NaCl III.0,02m Tham-HCl + 0,25 NaCl IV. 0,02m Tham-HCL + 0,5 NaCl Konstantes pH 8	Humankolostrum	Gewinnung und immunologische Charakterisierung von 7 Fraktionen. Bei Rechromatographie wurde eine immunologisch reine β_2A-Globulinfraktion gewonnen	87
	Antistreptolysin im Serum und Gammaglobulinfraktion	Nachweis der höchsten Antistreptolysinanktivität in d. Gammaglobulinfraktion des Serums und deren Subfraktionierung	93
Gradientenelution mittels 9-kammerigenVarigrades und 2-Flaschensystem	Blutgruppenantikörper	Auftrennung d. Blutgruppenantikörper d. ABO-Systems in 3 Regionen	245

Kontinuierliche Gradientenelution im 2-Kammersystem. Anfangspuffer: Phosphatpuffer 0,01 m pH 8 Grenzpuffer: Phosphatpuffer 0,3 m pH 4,5	Serumproteine in normalen und pathologischen Sera	Aufteilung d.Serumproteine in verschiedene Fraktionen: abnormes Protein(Myelom) in d. Gammaregion. In einem Fall Trennung d. normalen Gamma vom pathologischen Gamma. Subfraktionierung von Gammaglobulin	51
Wie oben	Vitamin B_{12} bindendes Protein	Auftreten in einer einzigen Zacke am Ende des Chromatogramms	51
Verschiedene Graduentenelutionen	Serumproteine von Pferd und Mensch	Aufteilung der Serumproteine in verschiedene Fraktionen. Elektrophoretische und immunoelektrophoretische Charakterisierung d. einzelnen Fraktionen. Genaue Beschreibung der Methode	21o
Linear steigende Molarität und absinkendes pH. Anfangspuffer:350ml 0,01m Phosphatpuffer pH 8 mit Grenzpuffer:0,3m KH_2PO_4	Serumproteine bei einem Fall von Kälteagglutininkrankheit	Kälteagglutinine waren in zwei Komponenten anwesend	239
Gradientenelution mit steigender Salzkonzentration. Anfangspuffer: 0,02m Phosphatpuffer pH 8	Serum	Trennung von Serumantikörpern:Mumps, Histoplasma capsulatum,Thyreoglobulin und Thyphus-H-Antikörper in Fraktion I(Gammaglobulin 6,6 S)Typhus-o-Antikörper und Rheumatoidfaktor in Fraktion V(Makroglobulin 18 S)	24o
Lineare Gradientenelution	Serum	Reinigung von Coeruloplasmin	3o

Zwei-Säulensysteme. Gradientenelution mit: a)0,005m Na-Phosphatpuffer pH 7 b)0,02m Na-Phosphatpuffer c)0,03m Na-Dihydrogenphosphat + 0,02m NaCl d)0,05m Na-Dihydrogenphosphat + 0,05m NaCl e)0,05m Na-Dihydrogenphosphat + 0,1m NaCl f)0,05m Na-Dihydrogenphosphat + 0,5m NaCl	Humanes und bovines Serum	Vergleichende Untersuchung zwischen human und bovine Serum	135
Gradientenelution von Phosphatpuffer 0,01m pH 7 zu 0,1m pH 5	Serumproteine bei Erkrankung der Leber, primäre Amyloidose, multiples Myelom, Makroglobulinämie und Normalserum	3 Typen von chromatographischen Mustern: I.Normalserum und Hyperglobulinämie u.Gammamyelome pH7 II.ß-Myelome (Peak bei pH6) III.Makroglobulinämie (pH5) Vergleichende immunologische Untersuchung sowie Ultrazentrifugenanalyse	131
Schrittweise Elution: I.Phosphatpuffer 0,005m pH 7 II.Phosphatpuffer 0,02m pH 6 III. Phosphatpuffer 0,018m pH 6 + 0,02m NaCl IV. Phosphatpuffer 0,06m pH 5 V. Phosphatpuffer 0,05m + 0,1m NaCl	Serumproteine (Überstand nach Ammoniumsulfatfällung)	Untersuchung der Serumproteine, speziell alpha-Globuline. Deren Verteilungsmuster bei verschiedenen Erkrankungen. Immunologische und elektrophoretische Charakterisierung.	227
Kontinuierliche Gradientenelution (2-Flaschensystem) Anfangspuffer: Na-Pfosphatpuffer 0,01m pH 8, Grenzpuffer: Na-Phosphatpuffer 0,3m pH 4,5	Serumproteine	Multidimensionales Studium von Plasmaproteinen mittels Säulenchromatographie, Stärkegel und Immunoelektrophorese	124

Gradientenelution 2-Flaschensystem Anfangspuffer: Na-Phosphat 0,01m pH 8,38 Grenzpuffer: Na-Phosphat 0,30m pH 4,24	Normale Serumproteine	Untersuchung von Nativserum, sowie elektrophoretisch gewonnene Komponenten mittels Chromatographie. Identifizierung u.Charakterisierung der Komponenten mittel Immunoelektrophorese,Elektrophorese und Ouchterlony-Test.	228
Schrittweise Elution: I. 0,005 m Phosphatpuffer pH 7 II. 0,02 m Phosphatpuffer pH 6	Serumproteine	Gewinnung von typischen chromatographischen Mustern bei der Untersuchung von Nativserum, Überstand sowie Präzipitat nach Ammoniumsulfatfällung. Elektrophoretische Charakterisierung der Fraktion.	29
Stufenweise Elution: ansteigende Salzkonzentration von NaCl in 0,0175 m Phosphatpuffer pH 6,3	Serumproteine	Einfache Methode zur Trennung von fluorescein-markiertem Gammaglobulin.Untersuchung markierter antibakterieller sowie antiviraler Antikörper	176
Kontinuierliche Gradientenelution: Anfangspuffer: 0,005m Phosphatpuffer pH 7,1 Grenzpuffer: 0,3m NaH_2PO_4. Für Gammaglobulin: Anfangspuffer: 0,01m Phosphatp.pH8,3 Grenzpuffer: 0,3m NaH_2PO_4	Serum und Gammaglobulin, gewonnen mittels Salzfällung und Zonenelektrophorese	Mittels Chromatographie gewonnene Gammafraktion hat eine Sedimentationskonstante von S=6,1-6,62. Gute Trennung von Makroglobulin. Untersuchung der metabolischen Heterogenität von Gammaglobulin durch Markierung mit J-131.	26
Kontinuierliche Gradientenelution mittels 9-kammerigen Varigrades: Kammer 1,2,3,5,7 mit Anfangspuffer: 0,02 m Phosphatpuffer Kammer 6,8,9 mit Grenzpuffer: 0,25 m	normale und pathologische Sera	Chromatogr.Studium von Gamma, β_2A,Makroglobulinämie u. normales Restgammagl. in Myelom- u.Makroglobulinämiesera. Jedes hat ein charakteristisches Muster.Normaler Gammagl.-Anteil war umso kleiner,je größer d.pathologische Teil war.Die Fraktion wurde mittels Elektroph. u. Ouchterlony weiter untersucht.	48

Elutionschromatographie: Puffer I.0,01m Phosphat pH 7,5 Puffer II.0,02m Phosphat pH 6,2 Puffer III.0,05m prim. Na-Phosphat Durchlaufen des I. Puffers bis kein Protein mehr erschien,dann Puffer II usw.	Humanserum	Einteilung des mittels Chromatographie gewonnenen Gammaglobulins in 4 Regionen. Diese wurden auf ihren Reagingehalt mittels Prausnitz-Küstner-Test geprüft.	103
Gradientenelution 2Flaschensystem. Konkaver Gradient. Anfangspuffer: 0,02m Phosphat pH 8 Grenzpuffer: 0,3m Phosphat pH 8	Durch präparative Elektrophorese gewonnenes Gammaglobulin	Einteilung des mittels präparativer Elektrophorese gewonnenen Gammaglobulins durch die Chromatographie in 5 Unterfraktionen. Fraktion 1-4 enthält nur 6,6S Gammagl.mit verschiedener elektrophoretischer Mobilität u. Kohlenhydratgehalt,jedoch gleicher immunologischer Eigenschaft. Fraktion 5 enthielt 18S Gammagl. mit größtem Kohlenhydratgehalt.	50
Gradientenelution wie oben	Myelomproteine	70% vom untersuchten Myelomprotein waren heterogen. 2 Typen von Heterogenität: elektrophoretischer Typ u. polymerer Typ. Untersuchung der Fraktionen mittels Stärkegel, Papierelektrophorese, Immunoelektrophorese, Immunostärkegelelektrophorese und Ultrazentrifuge	49
Schrittweise Elution mit Glycinphosphat. Konstanter Glycingehalt. Ansteigende Molarität von Na-phosphat. I.kein Phosphat pH 9 II.0,02m pH8 III.0,04m pH 7 IV. 0,08m pH 6 V. 0,16m pH 5 VI. 0,32m pH 5 VII.0,50m pH 5 VIII.1,0m pH 5 IX. 0,1m + 0,5m NaCl	Serumprotein	Mittels der Doppelsäulentechnik wurden chromatographische Muster von Normalseren mit Seren von akuter Leukämie und Myelom verglichen. Untersuchung der Fraktionen auf Isoagglutinine,Lipide und Kohlenhydratgehalt und elektrophoretische Charakterisierung.	166

Gradientenelution mittels einer Apparatur bestehend aus 3 Gefässen (2 Erlenmeyerkolben und 1 Rundkolben) die miteinander komunizieren) Anfangspuffer: 0,005m Phosphat pH8,6 0,040m Tris Grenzpuffer: 0,35m Tris H_2PO_4	Humanserum	Chromatographische Untersuchung des Nativserums, des Überstandes und des Präzipitates nach Ammoniumsulfatfällung. Bestimmung von elektrophoretischer Mobilität, Kohlenhydratgehalt.	155
Elution mit 0,0175m Phosphatpuffer pH 6,3	Serumprotein	Eine einfache Methode zur Gewinnung von Gammaglobulin, Prüfung des Antikörpergehaltes	128
Gradientenelution Anfangspuffer: Phosphatpuffer 0,005m pH 7 Grenzpuffer: 0,3m pH 5,5	Urin	Untersuchungen von verschiedenen Proteinurien mittels Säulenchromatographie, Immunoelektrophorese Agarelektrophorese. Die Bence-Jones-Proteine konnten von den übrigen Proteinen getrennt werden.	98
Gradientenelution für Rinderalbumin: I. 0,005m Na-Phosphat pH 6,8 II. 0,013m Phosphatp. pH 6,8 + 0,073m NaCl Puffer III-X ist derselbe Phosphatpuffer, jedoch mit steigender NaCl-Konzentration wie folgt: III. 0,093m, IV. 0,11m V. 0,130m, VI. 0,160m, VII. 0,100m, VIII. 0,21m, IX. 0,240m, X. 0,270m. Für Humanserum: 2Flaschensystem: Anfangspuffer: 0,01m Na-Phosphatpuffer pH 8 Grenzpuffer: 0,3m prim. Na-Phosphat.	Kristallines Rindermerkaptalbumin, Humanalbumin gewonnen durch Chromatographie und Elektrophorese	Aminosäurenbestimmung in den einzelnen Fraktionen: 3 Rinder-Merkaptalbuminfraktionen waren im Aminosäurenmuster identisch, eines der 3 Humanalbuminen differiert in seinem Cystingehalt. Human- und Rinderalbumin differieren in ihrem Gehalt an Asparaginsäure.	111

Kontinuierliche Gradientenelution im 2Flaschensystem: Anfangspuffer: 0,005m pH 7 Grenzpuffer: 0,3m pH 4,5	Urin	Harneiweiße wurden bei Nephrosen u. Amyloidnephrosen mittels Chromatographie, Agar- und Immunoelektrophorese untersucht.	32
Schrittweise Elution mit steigender Salzkonzentration und abnehmendem pH I. Phos.P. 0,005m pH 7 II. " 0,020m pH 6 III." 0,050m pH 4,5 primäres Na-Phosphat IV. " " + 0,02m NaCl 0,05m pH 4,5 V. 0,05m prim.Na-Phosph. + 0,05m NaCl pH 4,5 VI. 0,05m prim.Na-Phosph. + 0,10m NaCl pH 4,5	Serumproteine	Aminosäurenanalyse in 9 chromatographischen Fraktionen.	122
Gradientenelution: Die Zusammensetzung war bei den einzelnen Versuchen verschieden.	Serumproteine	Chromatographische Trennung d. Serumproteine in verschiedene Fraktionen, Untersuchung dieser auf Gehalt an Blutkörperchenantikörper.	216
Verwendung verschiedener Gradienten.	Normalserum, phathologisches Human- und Tierserum, sowie Extrakte aus Pankreasdrüsen	Beschreibung der einzelnen substituierten Cellulosen u. ihr Anwendungsgebiet: somit Prinzip d. Methode. Untersuchung des Einflusses d. Durchflussrate u. andere Faktoren in der Chromatographie. Verschiedene Befunde werden mitgeteilt.	214
	Bence-Jones-Proteine	Neben anderen Methoden wurde auch die Säulenchromatographie bei der Untersuchung der Bence-Jones-Proteine verwandt.	139

Kontinuierliche sowie diskontinuierliche Gradientenelution von 0,005 mol Phosphatpuffer pH 7 zu 0,3 m Phosphatpuffer pH 4,5	Plasmafraktion I gewonnen nach Methode VI von Cohn und Mitarbeitern	Mit DEAE-Cellulose u. Gradientenelution war es möglich Fibrinogen von anderen Proteinen der Fraktion I von Cohn zu trennen. Dies war mit unbehandelter Cellulose nicht möglich.	72
Gradientenelution Die Puffer bestehen aus: I. 0,02m Glycin, 0,02m KH_2PO_4 u. 0,02m KH_2PO_4 II. 0,02m Glycin, 0,1m KH_2PO_4, 0,1m NaCl, 0,03m HCl	Ei-Eiweiss und andere biologische Materialien	Ei-Eiweiß sowie andere biologische Materialien konnten mittels Chromatographie in verschiedene Fraktionen getrennt werden. Dabei wurden mehr Details aufgedeckt als mit der Elektrophorese.	134
Gradientenelution mit Na-Phosphatpuffer pH 7,68 Anfangspuffer: 0,007 m Grenzpuffer: 0,7 m	Menschliches Gammaglobulin (normales sowie Myelomprotein)	Trennung der durch Papain-Verdauung gewonnenen Gammaglobulin-Fragmente (F und S-Komponente)	45
Gradientenelution für Trennung der Gammaglobulinfragmente: von 0,02m Phosphatpuffer zu 0,5m Phosphatpuffer	Normales und pathologisches Humanserum sowie gereinigtes Gammaglobulin	1. Herstellung von reinem 7S-Gammaglobulin (normales u. patholog.) und Gamma$_1$-Globulin 2. Herstellung von reinem normalem Gamma$_1$-M-Globulin aus Präzipitaten, die durch Dialyse des Serums gegen Wasser bei 4°C gewonnen wurden. 3. Trennung der durch Papain-Verdauung erhaltenen Fragmente. (F u. S-Komponente). Weitere Untersuchung der Fragmente mittels: Elektrophorese, Aminosäureanalyse, N-ständige Aminosäurebestimmung, Immunoelektrophorese und Ouchterlony-Test.	24

Gradientenelution zur Refraktionierung der mittels CM-Cellulose gewonnenen Fraktion I mit 0,01m Phosphatpuffer pH 6,4 zu 0,2m Phosphatpuffer pH 6,2	Kaninchenserum und Gammaglobulin	Herstellung von Kaninchen-Gamma-Globulin. Trennung d. durch Papain-Verdauung gewonnenen Globulinfragmente mittels CM und DEAE-Cellulose in Fraktion I,II,III.	165
Kontinuierliche oder schrittweise Elution. Anfangspuffer: 0,01m Phosphatpuffer pH 8 Grenzpuffer: 0,3m Phosphatpuffer pH 8	Human-Gamma-Globulin	Trennung der durch Papain-Verdauung gewonnenen Gamma-globulin-Fragmente in A,B und C. Weitere chemische und biochemische Untersuchungen.	60
Gradientenelution: Anfangspuffer: Acetatpuffer 0,01m Grenzpuffer: Acetatpuffer 0,5m	Normales Gammaglobuline bzw. Immunglobuline und Paraproteine	Trennung der durch Papain-Verdauung gewonnenen Fragmente in Kombination mit CM-Cellulose. Vergleichende Untersuchungen zwischen normalen und pathologischen Gammaglobulinbruchteilen.	40 62
Kontinuierliche sowie diskontinuierliche Gradientenelution. Pufferzusammensetzung bei diskontinuierlicher Elution: 1. 12ml 0,008m Na-Phosphatpuffer pH 7 2. 10ml 0,02m Na-Phosphatpuffer pH 6 3. 10ml 0,05m Na-Phosphatpuffer pH 6 4. 24ml 0,2m Na-Phosphatpuffer pH 6 + 0,2 m NaCl Säule: 6-8cm mal 0,8 Elutionsgeschwindigkeit: 0,1ml/min.	1. Menschliche Leber durch Punktion bei verschiedenen Erkrankungen gewonnen. 2. Rattenleber: normale u. nach Tetrachlorkohlenstoffvergiftung.	Chromatographische Trennung der Isozyme von MDH, GOT u. CDH. Die Isozyme von Malat- und Isocitrat-Dehydrogenase u. Glutamat Oxalat-Transaminase ließen sich auch in isolierten Leberparenchymzellen nachweisen. Ihre Verteilung auf cytoplasmatischem u. mitochondrialem Raum oder auf chromatographisch getrennte C- und M-Isozyme zeigten Unterschiede zwischen Rattenleber u.d.menschlichen Leber. Keine deutliche Veränderung der C-/M-Isozymreaktionen von GOT u. MDH konnte bei verschiedenen Lebererkrankungen festgestellt werden.	74

Diskontinuierliche Gradientenelution. Puffer: 1.0,008m Na-Phosphat-puffer pH 7 2.0,02m Na-Phosphat-puffer pH 6 3.0,05m Na-Phosphat-puffer pH 6 4.0,2m Na-Phosphat-puffer + 0,2m NaCl Säule: 45 mal 0,9cm	1.Menschliche Leber gewonnen durch Leberpunktion 2.Rattenleber	Wie in der Rattenleber sind auch in d.menschlichen Leber 4 Isozyme d.sauren Phosphatase nachweisbar,wenn auch in gering veränderter prozentualer Verteilung. Auch die isolierten Leberparenchymzellen besitzen diese 4 Isozyme.Die Befunde werden durch Rechromatographie erwiesen. Das Verhalten dieser Isozyme in dem mitochondrialen u.cytoplasmatischen Raum wurde weiter untersucht.	175
Kontinuierliche Gradientenelution. Dem in einem Kühlgefäß befindlichen Puffer (300ml 0,01m) wird über ein Hebersystem aus einem 2.Gefäß fortlaufend 1m NaCl (300ml) zugeführt.	Serum und Urin eines Patienten mit Wegenerscher Granulomatose	Immunologische Untersuchung bei Wegenerscher Granulomatose mit Nachweis von Gammaglobulin-Antikörpern in verschiedenen chromatographisch getrennten Elutionsfraktionen. Untersuchung auf Gm-Faktoren und Gm-Antikörper.	88
Elutionschromatographie mit 0,08m Tris-HCl-Puffer pH 8 Säule: 300 mal 2,5 cm Elutionsgeschwindigkeit: 2-3Tr./sec Fraktionen zu 10 ml	Carbonat-Hydro-Lyase aus Rindererythrozyten. Rohenzym Alpha u.Rohenzym Beta wurde auf die Säule aufgetragen.	Carbonat-Hydro-Lyase wurde aus Rindererythrozyten isoliert, durch Chromatographie an DEAE-Cellulose u. Zonenelektrophorese gereinigt und einige ihrer physikalischen u. chemischen Eigenschaften studiert.	129 130

Gradientenelutions-chromatographie des Serums und des Urins wie folgt: 0,005m Na-Phosphat-puffer pH 8 0,3m Na-Phosphat-puffer pH 8	Normalseren, Myelomseren und Urin	Gewinnung von 6,6 S Gamma-Globulin, Bence-Jones-Protein und Myelomprotein. 2 Typen von Gamma-Globulin mit unterschiedlichen Antigendeterminanten wurden beschrieben (I und II). Alle Einzelseren enthalten Gamma-Globulinmoleküle - sowohl d.Typ I als auch d. Typ II. Das Verhältnis d.Typ I zu Typ II ist bei Normalserum 2:1, bei den Gamma-Mikroglobulinen des Normalurins etwa 1:1.	47
Elutionschromatographie mit 0,01m Na-Phosphatpuffer pH 8 und Gradientenelutionschromatographie nach	Serum und vorgereinigte Fraktionen mittels Pevikon-Block-Elektrophorese	Es wird über einen Fall mit autoimmunbedingter hämolytischer Anämie, bei der Anti-N nachgewiesen werden konnte, berichtet. Isolierung der 7S-Gammaglobuline, Chromatographie des Serums und Bestimmung des Anti-N in Eluatfraktionen.	99
Gradientenelutions-chromatographie.	Serum und Urin eines Patienten mit Makroglobulinämie und Begleit-Bence-Jones-Proteinurie.	1.Isolierung von Makroglobulin, 7 S-Globulin u.Bence-Jones-Protein in Kombination mit Chromatographie an CM-Cellulose. 2. Spaltung des Makroglobulins in"L-chain"u."H-chain". 3.Trennung u.Isolierung des L-u.H-chain mittels Gelfiltration-Sephadex-Säulen. Es wurde festgestellt, daß das L-chain der Serum-Makroglobuline chemisch und immunologisch mit dem Bence-Jones-Protein im Urin identisch ist.	75

Gradientenelutionschromatographie unter Verwendung eines linearen Gradienten mit 0,0125 - 1,0 m Ammoniumbicarbonat.	Leberhydrolysat	Ein kupferhaltiges Protein, Hepatokuprien, wurde aus subzellulär löslichen Fraktionen der menschlichen Leber isoliert und mit Cerebrocuprein I und Erythrocuprein verglichen.	163
Gradientenelutionschromatographie wie bei Fahey. Mit einer Ausnahme: Bei manchen Fällen wurde am Ende des Chromatogramms mit 0,4m NaH_2PO_4 + 2 m NaCl nacheluiert.	Plasmaproteine	Normalplasma sowie Plasma von Patienten mit verschiedenen Krankheiten wurden chromatographisch untersucht. Die Elutionsfraktionen wurden weiterhin mittels Stärke-Gel- und Papierelektrophorese weiter analysiert u. die Befunde mitgeteilt.	102
Salzgradienten mittels Zugabe von 0,3 m NaCl, nachdem die Extinktion auf 0,05 abgefallen war. Die Säule war mit 0,04m Tris + 0,01 m Versene pH 6-7 equilibriert.	Pankreasdrüse	Zur Reinigung von Insulin erwies sich die Chromatographie an DEAE-Cellulose als zusätzliche Methode brauchbar.	208
	Kaninchen-Gamma-Globulin	Zelluläres Studium der Kaninchen-Gammaglobulin-Allotypen A_4 und A_5. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß beide Gamma-Globulintypen von derselben Zelle gebildet werden.	
Gradientenelutionschromatographie: Säule 1,2 mal 45 cm Puffergradient mit ansteigender Molarität, von 0,01m → 0,3m Phosphat und abfallendes pH von 8,0 → 4,4	Partiell gereinigtes Histoplasmin	Isolierung der spezifischen Antigene von Histoplasma capsulatum.	78

Gradientenelution mit NaCl-Gradienten: Na-Phosphatpuffer 0,025m pH 8 + 0,2 m NaCl.	Partiell gereinigter Serumfaktor I und II	Eine neue Methode zur Untersuchung des zytotoxischen Effektes von Blutserum (spezifisch und unspezifisch) wurde entwickelt. Das untersuchte System besteht aus einem Faktor, der sich ähnlich wie "Properdin"an Zymosan adsorbiert (Serumfaktor I) und einem Kofaktor, dessen Lokalisierung durch Fraktionierung des Serums verfolgt wurde (Serumfaktor II). Beide Faktoren haben γ- oder β_2-Globulincharakter.	182
Gradientenelutionschromatographie mit Pufferwechsel an einer bestimmten Stelle des Chromatogramms. Puffer: 0,05m Phosphat pH 7,6. Einzelheiten der Methode bei Franklin, E.C., J.Clin.Invest. 39, 1933 (1960)	Papainverdautes γ_{SS}-Globulin	Es wurde festgestellt, daß nur serologisch erfaßbare Gm-Gruppen-Eigenschaften des humanen γ-Globulins gemeinsam auf dem gleichen Anteil dieses Proteins lokalisiert sind, u. zwar auf der F-Komponente desselben. Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit d. formalgenetischen Kentnissen über die Vererbung des Gm-Systems. Die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Physiologie und Pathologie des Gamma-Globulin-Systems wurde ausführlich diskutiert. Die Inv-Gruppen sind auf S-Komponenten des Gamma-Globulins lokalisiert.	35

Elutionschromatographie mit 0,02m Tris-HCl-puffer pH 8,1	Urin eines Patienten mit multiplem Myelom	Es wurde ein basisches Protein, Molekulargewicht 17000 isoliert in kristalliner Form dargestellt und serologisch weiter untersucht. Neben diesem Protein, das als γ_L bezeichnet wird, wurde das klassische Bence-Jones-Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 35000 aus demselben Urin isoliert. Das γ_L-Protein läuft in der Säule mit der Elutionsfront u. wird von DEAE-Cellulose nicht zurückgehalten.	234
Schrittweise Elution: Puffer: Na-Phosphat mit unterschiedlicher Molarität und pH	Thyroid-Extrakt vom Schwein	Auftrennung in 5 Fraktionen: Peak 3 enthielt Thyroglobulin in sedimentationsanalytisch 99-100% homogener Form, Peak 1 ein rotbraunes Protein mit Absorptionsmaximum bei 407 mμ (Thyralbumingemisch), Peak 2, eine Gruppe von langsam sedimentierendem Material die den Beimengungen der Serumproteine entspricht. Peak 4, Komponente entspricht d. Thyroglobulin. Peak 5 wurde nicht weiter untersucht.	235
Gradientenelutionschromatographie: Ein linearer Gradient mit steigender Molarität und abfallendem pH wurde durch Mischung von 350 ml 0,01m Phosphatpuffer pH 8 mit 350 ml 0,3m KH_2PO_4-Lösung realisiert.	Serum	Immuno- und Stärkegelelektrophorese sowie Säulenchromatographie der Serumproteine bei einem Fall von Kälteagglutinin-Krankheit mit sogenannter Ahaptoglobulinämie.	241

Gradientenelution mit folgenden Puffern: I. 130 ml 0,005m Phosphat ph 7,2 II. 70ml 0,02m Phosphat pH 6 III. 160ml 0,05m NaH_2PO_4 IV. 100ml 0,05m NaH_2PO_4 + 0,02m NaCl V. 250ml 0,05m NaH_2PO_4 + 0,05m NaCl VI. 293ml 0,6m NaH_2PO_4 + 0,1m NaCl VII. 100ml 0,5m NaH_2PO_4. Durchflußrate 36ml/h. Säule von 2cm Ø und 10g DEAE-Cellulose Inhalt.	J^{131}-markiertes Thyroglobulin, gewonnen aus Schilddrüsenextrakt eines Patienten und Normalserum	Inkomplette Trennung des Thyroglobulins von d. Serumproteinen. Aufteilung in 2 Subfraktionen.	217

Die vorliegende Arbeit wurde an der 1. Medizinischen Klinik der Universität München(Direktor:Prof.Dr.H.Schwiegk) durchgeführt.
Herrn Professor Dr.H.Schwiegk und Herrn Privatdozent Dr.M.Knedel erlaube ich mir für die freundliche Überlassung des Themas,des Institutmaterials,der Benützung der Institutseinrichtungen und die Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit meinen ergebensten Dank auszusprechen.

L e b e n s l a u f

Am 4.8.1934 wurde ich als eines von vier Kindern des Architekten Abolghassem Fateh-Moghadam in Teheran/Iran geboren. Nach dem Besuch der unteren Schulen und anschließend des Alborz-College erhielt ich im Juli 1953 das Reifezeugnis.

Mein gesamtes medizinisches Hochschulstudium absolvierte ich an der Universität München. Es begann mit dem Sommersemester 1954, das Physikum wurde im Sommer-Semester 1956 abgelegt und das Staatsexamen beendete ich am 21.12.1959. Note: Sehr gut.

Anschließend an das Staatsexamen begann ich meine Tätigkeit als Medizinalassistent an der I.Medizinischen Universitätsklinik München, wo ich bis 31.12.1960 auf einer Männerstation arbeitete. Vom Januar bis einschließlich Juni 1961 erfolgte eine chirurgische und geburtshilfliche Ausbildung in der Chirurgischen und Gynäkologisch-geburtshilflichen Klinik Dr.Wolfart, Gräfelfing bei München. Nach einer anschließenden 3monatigen Praxistätigkeit unter fachinternistischer Leitung trat ich am 1.10.1961 als Medizinalassistent in das Institut und die Poliklinik für physikalische Therapie und Röntgenologie-Abteilung Röntgendiagnostik- der Universität München ein. Vom 1.April bis 31.Juli 1962 war ich anschließend nochmals in der schon genannten Klinik in Gräfelfink tätig.
Bis zu diesem Zeitpunkt wurden somit die für die Erteilung einer Bestallung als Arzt erforderlichen Voraussetzungen erfüllt. Im September 1962 erhielt ich durch das Bayerische Staatsministerium die Erlaubnis zur Ausübung des ärztlichen Berufes an der I.Medizinischen Klinik München gemäß § 10 der Bundesärzteordnung. Seit dieser Zeit bin ich an der I.Medizinischen Universitätsklinik München (Direktor Professor Dr.med.H.Schwiegk) tätig und arbeite im Laboratorium für Eiweiß- und Immunochemie an wissenschaftlichen Forschungsaufgaben.